

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

DÉVELOPPEMENT ET CARACTÉRISATION DE
NOUVEAUX RADIOLIGANDS POUR L'ÉTUDE DES
RÉCEPTEURS DES HORMONES PEPTIDIQUES.

par

ROGER BOSSÉ

Thèse présentée à la Faculté
de Médecine en vue de l'obtention
du grade de Philosophiae Doctorat (Ph.D.)

14 mai 1993



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services Branch

395 Wellington Street
Ottawa, Ontario
K1A 0N4

Bibliothèque nationale
du Canada

Direction des acquisitions et
des services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa (Ontario)
K1A 0N4

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted an irrevocable non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of his/her thesis by any means and in any form or format, making this thesis available to interested persons.

L'auteur a accordé une licence irrévocable et non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de sa thèse de quelque manière et sous quelque forme que ce soit pour mettre des exemplaires de cette thèse à la disposition des personnes intéressées.

The author retains ownership of the copyright in his/her thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège sa thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

ISBN 0-612-09423-5

Canada

Je dédie cet ouvrage à mes parents,

Et vous passiez en souriant
Et vous disiez il est habile...
Et vous passiez en souriant.
Mais aucun de vous n'a donc vu
Que mes mains tremblaient de tendresse
Que tout le grand songe terrestre
Vivait en moi pour vivre en eux
Que je gravais aux métaux pieux mes dieux.
Qu'ils étaient le visage vivant de ce que nous avons senti du monde
Du vent, de la forêt et de la mer
De toutes les choses en notre chair
Et qu'ils sont nous, divinement.

Henri de Régnier.

DÉVELOPPEMENT ET CARACTÉRISATION DE
NOUVEAUX RADIOLIGANDS POUR L'ÉTUDE DES
RÉCEPTEURS DES HORMONES PEPTIDIQUES.

par ROGER BOSSÉ

Thèse présentée à la Faculté de Médecine de l'Université de Sherbrooke
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctorat (Ph.D.)

Nous présentons le développement d'une méthode alternative de marquage des peptides: la réaction de Gattermann/Sandmeyer. A l'aide de cette technique nous avons produits des radioligands à partir d'hormones peptidiques synthétiques et de composés non-peptidiques comportant dans leur structure une fonction aniline. Nous présentons la caractérisation pharmacologique de 9 nouveaux ligands. Nous avons produits deux analogues de l'angiotensine II (1 peptidique et 1 non-peptidique), cinq analogues des récepteurs opiacés (1 non-sélectif, 2 sélectifs μ , 1 sélectif δ et 1 sélectif κ), un analogue de la vasopressine et un de la bradykinine. Ainsi nous avons conçu des radioligands dans une familles de composés où perdurait une lacune de traceurs sélectifs à haute radioactivité spécifique: les enképhalines. Tous les radioligands démontrent une affinité par essai de liaison (K_d) de l'ordre du nM. Nous avons noté que des radioligands issus de composés à priori sélectifs gardaient dans l'ensemble une bonne sélectivité. Nous avons synthétisé un nouveau radioligand photoactivable de l'angiotensine II: le ^{125}I -Bpa-Ang. Ce ligand a démontré d'excellentes propriétés de liaison et d'incorporation dans des études de photomarquage. Nous avons, en dernier lieu, procédé à une étude exploratoire visant à déterminer si nos radioligands marqués via la réaction de Gatterman/Sandmeyer pouvaient servir de traceur lors d'expériences de localisation in vivo. Par étude scintigraphique, nous avons prouvé que les peptides iodés sur un résidu Phe étaient inertes à l'action des désiodases et ce jusqu'à 24 heures suivant l'administration des radioligands. Il est possible de visualiser les sites de distribution des radioligands et/ou de leurs métabolites. Des courbes de distribution et de clairance par les divers organes impliqués dans la biotransformation et l'élimination des composés bioactifs furent faites de façon non-invasive. Des mesures sommaires de la spécificité de la distribution des radioligand ont été produites. Cependant, il reste à optimiser certaines conditions afin d'obtenir des valeurs plus significatives concernant la spécifité de la distribution des radioligands.

Remerciements

J'exprime ma plus profonde reconnaissance au Dr Emanuel Escher pour m'avoir si généreusement accueilli dans son laboratoire. Ses conseils judicieux, son sens critique et l'originalité qu'il sait transmettre m'ont été plus que précieux.

Je tiens aussi à remercier les correcteurs de cet ouvrage: les Drs Hans Zingg, Johannes Van Lier et Domenico Regoli. Mes remerciements s'adressent aussi à Jacques Rousseau pour les études d'imagerie γ ; à Li-Ming Zhou pour la synthèse du Bpa; à Marie-Reine Lefèbvre et Richard Laprise pour leur support technique de tous les instants. Je désire aussi remercier la compagnie Bio-Méga (Laval) pour son support financier. Je remercie les compagnies ICI-Pharmaceuticals, Parke-Davis et Merck-Dupont pour m'avoir généreusement procuré le ICI-M201163, le PD123177 et le L-158,809 respectivement .

Merci enfin à tous les gens du département et de la faculté qui ont participé de près ou de loin à mon apprentissage.

TABLE DES MATIERES

RESUME	i
REMERCIEMENTS	ii
TABLE DES MATIERES	iii
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX	xiii
LISTE DES ABBREVIATIONS	xiv

INTRODUCTION

A) Les radioligands	1
B) Problématique	2
C) L'iodation des peptides par la réaction de Gattermann/Sandmeyer	4
D) Objectifs de l'étude	6

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A) Matériel	
- Iodation de l'angiotensine II avec Iodo-Gen	12
- Iodation des composés par la réaction de Gattermann/Sandmeyer	12

- Purification des composés marqués	12
- Analyse chimique par HPLC des composés marqués et analyse des métabolites des composé iodés au ¹³¹ I excrétés par les lapins	13
- Mesure des coefficients de partition des produits iodés	13
- Préparations microsomales de membranes de cortex surrénalien bovin, de cerveaux de cobayes ou de rats et des couches musculaires d'iléon de cobayes	13
- Dosage de protéines des préparations microsomales par la méthode de Lowry	14
- Préparation de l'aorte de lapin et de l'iléon de cobaye pour les essais de tensiométrie	14
- Essais de liaison des analogues de l'angiotensine sur membranes de cortex surrénalien bovin	14
- Essais de liaison des analogues de l'enképhaline sur membranes de cerveaux de cobayes et de rats	14
- Essais de liaison des analogues de la bradykinine sur membranes d'iléon de cobayes	15
- Essais tensiométriques des analogues de l'angiotensine II sur aorte de lapin et des analogues de la bradykinine sur l'iléon de cobaye	15
- Imagerie-γ des composés marqués au ¹³¹ I	15

B) Méthodes

- Iodation de l'angiotensine II avec Iodo-Gen	16
- Iodation des composés par la réaction de Gattermann/Sandmeyer	16
- Purification des composés marqués	19
- Analyse chimique par HPLC des composés marqués et analyse des métabolites des composé iodés au ¹³¹ I excrétés par les lapins	20
- Mesure des coefficients de partition des produits iodés	20
- Détermination de l'activité spécifique des radioligands	23
- Préparations microsomales de membranes de cortex surrénalien bovin, de cerveaux de cobayes ou de rats et des couches musculaires d'iléon de cobayes	24
- Dosage de protéines des préparations microsomales par la méthode de Lowry.	25

- Préparation de l'aorte de lapin et de l'iléon de cobaye pour les essais de tensiométrie	26
- Essais de liaison des analogues de l'angiotensine II sur membranes de cortex surrénalien bovin	29
- Essais de liaison des analogues de l'enképhaline sur membranes de cerveaux de cobayes et de rats	30
- Essais de liaison des analogues de la bradykinine sur membranes d'iléon de cobayes.	31
- Essais tensiométriques des analogues de l'angiotensine II sur aorte de lapin et des analogues de la bradykinine sur l'iléon de cobaye	31
- Imagerie- γ des composés marqués au ^{131}I	32

RÉSULTATS

A) Structure des composés et sites d'iodation	35
B) Calibration du système d'acquisition des signaux U.V. et γ	35
C) Variation de la rétention d'un composé sur une colonne C_{18} en fonction de l'environnement ionique	38
D) Iodation du $[\text{Sar}^1, \text{Val}^5, \text{NO}_2\text{-D-Phe}^8]\text{Ang}$ ($\text{NO}_2\text{-Ang}$) par la réaction de Gatterman/Sandmeyer et essais de liaison du radioligand obtenu	41
E) Iodation du $[\text{DMPP}^1, \text{NO}_2\text{-Phe}^2, \text{Val}^4, \text{Lys}^8, \text{D-Tyr}^9]\text{VP}$ ($\text{NO}_2\text{-VP}$) par la réaction de Gattermann/Sandmeyer et essais de liaison du radioligand obtenu	45
F) Iodation du $[\text{NO}_2\text{-Phe}^4, \text{Leu}^5]\text{Enképhaline}$ ($\text{NO}_2\text{-Enk}$) par la réaction de Gattermann/Sandmeyer et essais de liaison du radioligand obtenu	48
G) Iodation du $[\text{D-Pen}^{2,5}, \text{NO}_2\text{-Phe}^4]\text{Enképhaline}$ ($\text{NO}_2\text{-DPDP}$) par la réaction de Gattermann/Sandmeyer et essais de liaison du radioligand obtenu	51

H) Iodation du Tyr-D-Arg-(NO ₂)Phe-Lys (NO ₂ -DALDA) par la réaction de Gattermann/Sandmeyer et essais de liaison du radioligand obtenu	54
I) Iodation du Tyr-D-Ala-Phe-NO ₂ Phe (NO ₂ -YaFF) par la réaction de Gattermann/Sandmeyer et essais de liaison du radioligand obtenu	58
J) Iodation du N-méthyl-N-[(1R,S)-1-(3-aminophényl)-2-(1-pyrrolidinyl)éthyl]acétamide (M201163 ou NH ₂ -ICI) par la réaction de Gattermann/Sandmeyer et essais de liaison du radioligand obtenu	61
K) Caractérisation des sites récepteurs des opiacés par essai de liaison du naloxone sur membranes de cerveaux de rats	65
L) Iodation de la [NO ₂ -Phe ⁵]BK (NO ₂ -BK) par la réaction de Gattermann/Sandmeyer et essais de liaison du radioligand obtenu	67
M) Iodation conventionnelle du [Sar ¹ ,Val ⁵ ,Bpa ⁸]Ang (Bpa-Ang) avec Iodo-Gen et essais de liaison du radioligand obtenu	71
N) Iodation du PD123177 par la réaction de Gattermann/Sandmeyer et essais de liaison du radioligand obtenu	78
O) Etude scintigraphique de la biodistribution des composés marqués au ¹³¹ I	84
DISCUSSION	124
CONCLUSION et PERSPECTIVES	154
ANNEXES (a-i)	157
BIBLIOGRAPHIE	166

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Réaction de Gattermann/Sandmeyer.	5
Figure 2.	Effet structural de l'addition d'un atome d'iode sur un résidu Phe	7
Figure 3.	Comparaison des structures des résidus Phe, N ₃ -Phe et Bpa	10
Figure 4.	Comparaison des mécanismes de photoactivation entre les résidus N ₃ -Phe et Bpa	11
Figure 5.	Résumé des manipulations lors dans une iodation par la méthode de Gattermann/Sandmeyer	18
Figure 6.	Montage utilisé lors de la purification des produits iodés	21
Figure 7.	Montage utilisé lors de l'analyse des produits iodés et des métabolites excrétés par les lapins lors des études d'imagerie- γ	22
Figure 8.	Montage des tissus pour les essais de tensiométrie avec l'aorte de lapin et l'iléon de cobaye	28
Figure 9.	Système d'analyse scintigraphique.	34
Figure 10.	Calibration du système d'acquisition des signaux UV et γ	37
Figure 11.	Variation de la rétention d'un composé sur une colonne C ₁₈ en fonction de l'environnement ionique	39
Figure 12.	Variation de la rétention d'un composé sur une colonne C ₁₈ en fonction de la composition ionique de l'éluant	40

Figure 13.	Iodation du [Sar ¹ , Val ⁵ , NO ₂ -D-Phe ⁸]Ang (NO ₂ -Ang) par la réaction de Gattermann/Sandmeyer	42
Figure 14.	Réduction du [Sar ¹ , Val ⁵ , I-Phe ⁸]Ang (I-Ang) par hydrogénation catalytique	43
Figure 15.	Essais de liaison (déplacement et saturation) du [Sar ¹ , Val ⁵ , ¹²⁵ I-D-Phe ⁸]Ang (¹²⁵ I-Ang) sur membranes de cortex surrénalien bovin	44
Figure 16.	Iodation du [DMPA ¹ , NO ₂ -Phe ² , Val ⁴ , Lys ⁸ , D-Tyr ⁹]VP (NO ₂ -VP) par la réaction de Gattermann /Sandmeyer	46
Figure 17.	Essais de liaison (déplacement et saturation) du [DMPA ¹ , ¹²⁵ I-Phe ² , Val ⁴ , Lys ⁸ , D-Tyr ⁹]VP (¹²⁵ I-VP) sur membranes de foie de rat	47
Figure 18.	Iodation du [NO ₂ -Phe ⁴ , Leu ⁵]Enképhaline (NO ₂ -Enk) par la réaction de Gattermann/Sandmeyer	49
Figure 19.	Essais de liaison (déplacement et saturation) du [¹²⁵ I-Phe ⁴ , Leu ⁵]Enképhaline (¹²⁵ I-Enk) sur membranes de cerveaux de rats	50
Figure 20.	Iodation du [D-Pen ^{2,5} , NO ₂ -Phe ⁴]Enképhaline (NO ₂ -DPDP) par la réaction de Gattermann/Sandmeyer	52
Figure 21.	Essais de liaison (déplacement et saturation) du [D-Pen ^{2,5} , ¹²⁵ I-Phe ⁴]Enképhaline (¹²⁵ I-DPDP) sur membranes de cerveaux de rats	53
Figure 22.	Iodation du Tyr-D-Arg-(NO ₂)Phe-Lys (NO ₂ -DALDA) par la réaction de Gattermann/Sandmeyer	55
Figure 23.	Essais de liaison (déplacement et saturation) du Tyr-D-Arg-(¹²⁵ I)Phe-Lys (¹²⁵ I-DALDA) sur membranes de cerveaux de rats	56

Figure 24.	Effet du BSA et du NaCl sur le déplacement du Tyr-D-Arg-(¹²⁵ I)Phe-Lys (¹²⁵ I-DALDA) par le naloxone sur membranes de cerveaux de rats	57
Figure 25.	Iodation du Tyr-D-Ala-Phe-(NO ₂)Phe (NO ₂ -YaPP) par la réaction de Gatterman/Sandmeyer	59
Figure 26.	Essais de liaison (déplacement) du Tyr-D-Ala-Phe-(¹²⁵ I)Phe (¹²⁵ I-YaPP) sur membranes de cerveaux de rats	60
Figure 27.	Séparation de liaison totale du Tyr-D-Ala-Phe-(¹²⁵ I)Phe (¹²⁵ I-YaPP) en ses composantes spécifique et non-spécifique	62
Figure 28.	Iodation du 2-(3,4-dichlorophényl)-N-méthyl-N-[(1R,S)-1-(3-aminophényl)-2-(1-pyrrolidiny)éthyl]acétamide (M201163 ou NH ₂ -ICI) par la réaction de Gattermann/Sandmeyer	63
Figure 29.	Essais de liaison (déplacement et saturation) du ¹²⁵ I-ICI sur membranes de cerveaux de cobayes	64
Figure 30.	Essais de liaison (déplacement et saturation) du ³ H-naloxone sur membranes de cerveaux de rats	66
Figure 31.	Iodation de la [NO ₂ -Phe ⁵]BK (NO ₂ -BK) par la réaction de Gattermann /Sandmeyer	68
Figure 32.	Essais de liaison (déplacement) de la [¹²⁵ I-Phe ⁵]BK (¹²⁵ I-BK) sur membranes d'iléons de cobayes	69
Figure 33.	Essais de liaison (saturation) de la [¹²⁵ I-Phe ⁵]BK (¹²⁵ I-BK) sur membranes d'iléons de cobayes	70
Figure 34.	Essais biologiques (tensiométrie) de la BK, I-BK et NO ₂ -BK sur des anneaux d'iléons de cobayes	72

Figure 35.	Chromatogramme d'une iodation conventionnelle du [Sar ¹ , Val ⁵ , Bpa ⁸]Ang avec Iodo-Gen	73
Figure 36.	Essais de liaison (déplacement et saturation) du [Sar ¹ , ¹²⁵ I-Tyr ⁴ , Val ⁵ , Bpa ⁸]Ang (¹²⁵ I-Bpa-Ang) sur des membranes de cortex surrénalien bovin	75
Figure 37.	Essais biologiques (tensiométrie) du Bpa-Ang sur des bandelettes d'aorte de lapin	76
Figure 38.	Mesure du pA ₂ du Bpa-Ang à l'aide d'un graphique de Hill.	77
Figure 39.	Iodation du PD123177 par la réaction de Gattermann /Sandmeyer tenue à 65°C pendant 3 heures	79
Figure 40.	Analyse des populations de sous-types de récepteurs AT ₁ et AT ₂ sur des membranes de cortex surrénalien bovin.	80
Figure 41.	Essais de liaison sur membranes de cortex surrénalien bovin des fractions A et B obtenues par iodation du PD123177 via une réaction de Gattermann/Sandmeyer tenue à 65°C pendant 3 heures	82
Figure 42.	Iodation du PD123177 par la réaction de Gattermann /Sandmeyer tenue à 4°C pendant 10 heures	83
Figure 43.	Essais de liaison sur membranes de cortex surrénalien bovin de la fraction de plus haut compte obtenue suite à l'iodation du PD123177 via une réaction de Gattermann/Sandmeyer tenue à 4°C pendant 10 heures	85
Figure 44.	Biodistribution du ^{m99} Tc-pyrophosphate 2.5 minutes p.i.	87
Figure 45.	Biodistribution du ^{m99} Tc-pyrophosphate à 1 heure p.i.	89

Figure 46.	Biodistribution des globules rouges marqués au ^{99m}Tc .	90
Figure 47.	Biodistribution du Na^{131}I , de la ^{131}I -Tyr, de la ^{131}I -Phe et de leurs sous-produits après 6 heures post-injection.	91
Figure 48.	Biodistribution du ^{131}I après administration i.v. de Na^{131}I .	92
Figure 49.	Biodistribution de la ^{131}I -Tyr et du ^{131}I après administration i.v.	93
Figure 50.	Analyse par HPLC du contenu radioactif urinaire suite à l'administration i.v. de ^{131}I -Tyr.	94
Figure 51.	Biodistribution de la ^{131}I -Phe après administration i.v.	95
Figure 52.	Analyse par HPLC du contenu radioactif urinaire suite à l'administration i.v. de ^{131}I -Phe.	97
Figure 53.	Comparaison des niveaux thyroïdiens de ^{131}I après administration i.v. de Na^{131}I , de ^{131}I -Tyr ou de ^{131}I -Phe.	98
Figure 54.	Vérification de la spécificité de la liaison des radioligands marqués au ^{131}I via la réaction de Gattermann/Sandmeyer.	99
Figure 55.	Biodistribution du ^{131}I -Ang avec ou sans pré-traitement au L-158,809	100
Figure 56.	Biodistribution du ^{131}I -Ang ou de ses métabolites après administration i.v.	103
Figure 57.	Effet du L-158,809 sur la présence du ^{131}I -Ang ou de ses métabolites au foie, aux poumons et aux reins.	104

Figure 58.	Analyse qualitative par HPLC du contenu radioactif urinaire suite à l'administration i.v. de ^{131}I -Ang.	105
Figure 59.	Biodistribution du ^{131}I -BK ou de ses métabolites 5 minutes après administration i.v.	106
Figure 60.	Biodistribution de la ^{131}I -BK ou de ses métabolites 1 heure après administration i.v.	107
Figure 61.	Biodistribution de la ^{131}I -BK ou de ses métabolites après administration i.v.	108
Figure 62.	Effet de la BK ou de ses métabolites sur la présence de la ^{131}I -BK ou de ses métabolites à l'intestin et aux reins.	109
Figure 63.	Analyse qualitative par HPLC du contenu radioactif urinaire suite à l'administration i.v. de ^{131}I -BK.	110
Figure 64.	Biodistribution du ^{131}I -DPDP ou de ses métabolites 5 minutes après administration i.v.	112
Figure 65.	Biodistribution du ^{131}I -DPDP ou de ses métabolites 1 heure après administration i.v.	113
Figure 66.	Biodistribution du ^{131}I -DPDP ou de ses métabolites après administration i.v.	114
Figure 67.	Effet du naloxone sur la présence du ^{131}I -DPDP ou de ses métabolites au foie et à la vésicule biliaire.	115
Figure 68.	Analyse qualitative par HPLC du contenu radioactif urinaire suite à l'administration i.v. du ^{131}I -DPDP.	117
Figure 69.	Biodistribution du ^{131}I -ICI ou de ses métabolites 5 minutes après administration i.v.	118

Figure 70.	Biodistribution du ^{131}I -ICI ou de ses métabolites 24 heures après administration i.v.	119
Figure 71.	Biodistribution du ^{131}I -ICI ou de ses métabolites après administration i.v.	120
Figure 72.	Effet du naloxone sur la présence du ^{131}I -ICI ou de ses métabolites au foie et à l'intestin.	121
Figure 73.	Analyse qualitative par HPLC du contenu radioactif urinaire suite à l'administration i.v. du ^{131}I -ICI.	123

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Structure des composés marqués	36
Tableau 2.	Résumé des propriétés des différents composés marqués.	125

LISTE DES ABREVIATIONS.

α_E :	activité intrinsèque
AcN:	acétonitrile
Ang:	angiotensine II
Bk:	bradykinine
Bpa:	benzoylphenylalanine
Cu:	cuivre
DMPA:	dimercaptopropionic acid
d.o.:	densité optique
Enk:	enképhaline
hre:	heure
i.v.:	intraveineux, intraveineuse
keV:	kilo-électron-volt
Kd:	constante d'affinité (de dissociation)
min:	minute
mmol:	millimole
nM:	nanomolaire
p.i.:	post-injection
R.S.:	radioactivité spécifique
$t_{1/2}$:	temps de demi-vie
TFA:	acide trifluoroacétique
VP:	vasopressine

INTRODUCTION

Les radioligands

On génère un radioligand en introduisant chimiquement un radioisotope à la structure originale d'un ligand. On peut classer les radioligands suivant l'aspect naturel ou synthétique de leurs structures. Les radioligands naturels sont ceux où sont introduits des radioisotopes de certains éléments existants préalablement dans la structure du ligand. Ces isotopes sont le ^3H , le ^{14}C , le ^{32}P et plus rarement le ^{35}S . Ces radioligands conservent les mêmes propriétés stériques, chimiques (hydrophobicité, point isoélectrique, etc.) et pharmacologiques (K_d , pD_2 , pA_2 , α^E , sélectivité, etc.) que leurs composés parents. Les radioligands non-naturels peuvent être produits de diverses façons: (1) incorporation de radioisotopes n'existant pas dans la structure native du composé, (2) introduction de fonctions porteuses de radioisotopes ou (3) synthèse chimique de composés non-peptidiques porteurs de radioisotopes et reproduisant les pharmacophores des substances naturelles. Les radioisotopes de l'iode (^{125}I , ^{131}I) et composés chimiques intégrant le ^{125}I (eg. réactif Bolton-Hunter, BOLTON et HUNTER, 1973) sont de loin, les intermédiaires les plus fréquemment employés pour produire des radioligands non-naturels. Les propriétés stériques, chimiques et pharmacologiques de cette classe de radioligands sont inévitablement modifiées.

Les radioligands sont essentiels en pharmacologie. On les utilise pour mesurer bon nombre de paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. En

pharmacodynamique, ils sont employés comme traceurs dans des essais de liaison où sont mesurées l'affinité relative (IC_{50}) ou absolue (K_d) des composés bioactifs. Les paramètres pharmacocinétiques évalués par l'intermédiaire des radioligands sont la biodistribution, la biotransformation et les divers modes d'élimination (clairance), et ce tant aux niveaux *in vivo* qu'*in vitro*. L'isolation et la caractérisation biochimique (eg. poids moléculaire) des récepteurs biologiques nécessite aussi l'emploi de radioligands. On procède au photomarquage des récepteurs à l'aide de radioligands porteurs de fonctions photoactivables (GUILLEMETTE et ESCHER, 1983).

Problématique

Le radiomarquage des hormones peptidiques invoque toujours certains compromis: d'une part entre la structure chimique du peptide et ses composantes biologiquement déterminantes (pharmacophores) et d'autre part entre la disponibilité des radioisotopes, leur propriétés radiochimiques et la chimie permettant leur introduction.

Parmi les radioisotopes des éléments retrouvés naturellement dans la structure des peptides, seul le 3H est d'utilisation courante puisqu'on peut l'introduire de diverses façons après synthèse (hydrogénation catalytique, échange catalytique ou par échange de type Wilzbach). Les inconvénients majeurs de la tritiation sont: une très faible radiation β , une faible radioactivité spécifique ($RS \approx 15 \text{ Ci/mmol/H}$ substitué) et la nécessité d'avoir recours à un équipement de radiosynthèse très onéreux. Le

marquage au ^{14}C et au ^{11}C n'est pas couramment pratiqué vu la lenteur du processus chimique invoqué, la faible RS du ^{14}C et la très courte demi-vie du ^{11}C . Il faut aussi noter que l'emploi de radioligands à faible RS ne permet pas une résolution (détection) instantanée satisfaisante tant lors d'essais de liaisons in vitro que in situ (autoradiographies de coupes tissulaires). On doit avoir recours soit à des agents de scintillation dispendieux, à des temps d'exposition aussi longs que 2 à 6 mois (DAM et QUIRION, 1986) et à des fortes quantités de radioligands. Cette dernière pratique représente un risque sérieux d'occupation de sites moins sélectifs voire spécifiques pour le ligand. Le ^{35}S a, quant à lui, des paramètres radiochimiques très intéressants: une haute RS ($\approx 1000 \text{ Ci/mmol}$) et une radiation β convenable (167 keV). Son introduction est cependant difficile et n'est utile que dans des cas bien précis (NEUGEBAUER, 1989).

Pour éviter les inconvénients mentionnés auparavant, on a recours à des isotopes d'éléments n'existant pas a priori dans la structure naturelle des peptides. Les isotopes de l'iode sont de loin ceux les plus employés. Une introduction chimique simple, d'excellentes caractéristiques radiochimiques et le coût minime du ^{125}I ont rendu l'iodation des peptides une pratique courante dans bien des laboratoires. De plus, la disponibilité d'autres isotopes de l'iode permettent l'application des techniques d'imagerie telles que l'imagerie γ , le SPECT-scan et PET-scan (MYERS, 1966).

Toutefois, plusieurs contraintes limitent l'iodation des peptides. La première et la plus importante est le manque de site potentiel d'introduction. Les techniques courantes d'iodation, telles que celle utilisant le réactif IodoGen (FRACKER et

SPECK, 1978) nécessitent la présence d'un résidu phénolique (tyrosine, Tyr) pour l'introduction de l'iode. Le résidu Tyr n'est évidemment pas présent dans la séquence de tous les peptides. Son addition peut être aussi biologiquement néfaste. On risque de modifier de façon innacceptable les profils chimiques et biologiques des composés modifiés par l'iodation d'un résidu Tyr (eg. enképhalines, vasopressine). L'addition du réactif de Bolton-Hunter, une méthode alternative d'iodation des peptides, peut être contre-indiquée pour la même raison. De plus, les résidus phénoliques iodés type "iodo-tyrosine" (ex. thyroxine) sont continuellement sujets à une désiodation enzymatique dans l'organisme (ROCHE et coll., 1954). De ce fait, les études d'imagerie in vivo avec des peptides marqués sont peu communes et ce malgré la disponibilité d'isotopes de l'iode très adéquats. Les isotopes ¹³¹I, ¹²³I et ¹²⁵I sont de très forts émetteurs γ (imagerie γ) et les isotopes ¹¹⁸I à ¹²⁴I des émetteurs de positrons (PET-scan).

Il devient alors nécessaire de trouver et d'appliquer une méthode alternative d'iodation des peptides permettant leur utilisation dans des cas où une ou plusieurs situations citées précédemment constituent un obstacle.

L'iodation des peptides par la réaction de Gattermann/Sandmeyer

Tel qu'observable à la figure 1., la réaction de Gattermann/Sandmeyer consiste essentiellement à substituer le fonction diazonium par un élément halogène et ce, sur un résidu diazophénylalanine intégré à la structure d'un peptide synthétique. En ce

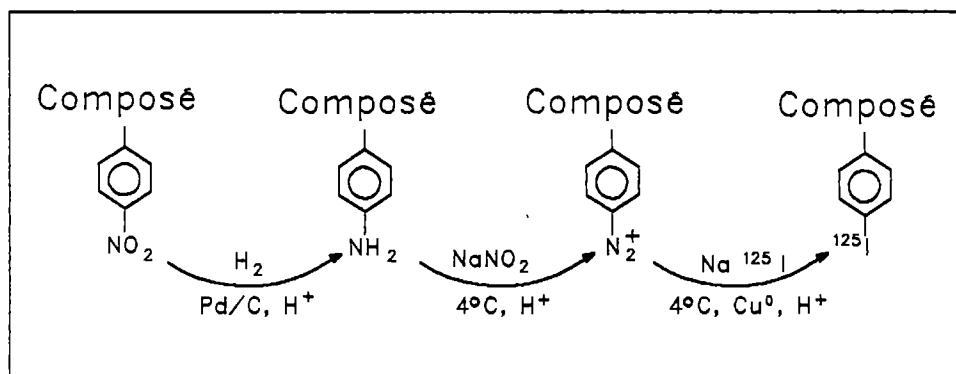


Figure 1. **Réaction de Gattermann/Sandmeyer.**

Les trois étapes de la réaction s'effectuent dans une solution d'acide sulfurique 0.1 N. On procède à la réduction du dérivé p-NO₂-Phe par hydrogénation catalytique. Le dérivé p-NH₂-Phe est ensuite transformé en sel de diazonium (p-N₂-Phe), la forme réactive qui pourra être iodée. L'halodéiodiazotation s'effectue dans la glace pendant environ douze heures. Le mélange réactionnel est finalement neutralisé avec de l'acétate d'ammonium pour être purifié.

qui nous concerne, l'halogène est évidemment de l'iode. Cette réaction, aussi appelée dédiazotation, s'effectue en milieu acide (H_2SO_4 0.1N) et est catalysée par du cuivre (Cu). Nous avons décidé d'utiliser le nom de "Gattermann/Sandmeyer" étant donné notre impossibilité de vérifier le mécanisme par lequel intervient le Cu à titre de catalyseur lors de la réaction. Notre technique requiert du Cu à l'état natif (Cu^0) alors que les réactions de Gattermann (GATTERMANN, 1890) et de Sandmeyer (PINE et coll., 1980) utilisent toutes deux un sel de Cu (CuX , X=halogène) comme catalyseur. Se basant sur ce qui est connu des mécanismes des réactions de Gattermann et de Sandmeyer, l'iode agirait comme radical libre (I^\cdot) issu d'un complexe de Cu et d'I (Cu^\cdotI) préalablement formé. L'iodation se produirait par substitution de la fonction diazonium d'un dérivé diazophényl par le radical I^\cdot .

Le changement structural induit par la réaction de Gattermann/ Sandmeyer est une légère augmentation du volume du résidu phénylalanine (Phe) comportant l'iode (fig.2). Chimiquement l'addition d'un atome d'iode augmente le caractère hydrophobe (BOSSÉ, 1990) du résidu Phe. Cependant ces changements sont mineurs car dans le passé il a été prouvé que des peptides iodés sur un résidu Phe conservaient dans l'ensemble d'excellentes propriétés biologiques (LEDUC et coll.-1983, BOSSÉ-1989).

Objectifs de l'étude

Après avoir démontré les possibilités de la réaction de Gattermann/ Sandmeyer dans l'iodation des peptides (BOSSÉ, 1989), une étude plus exhaustive

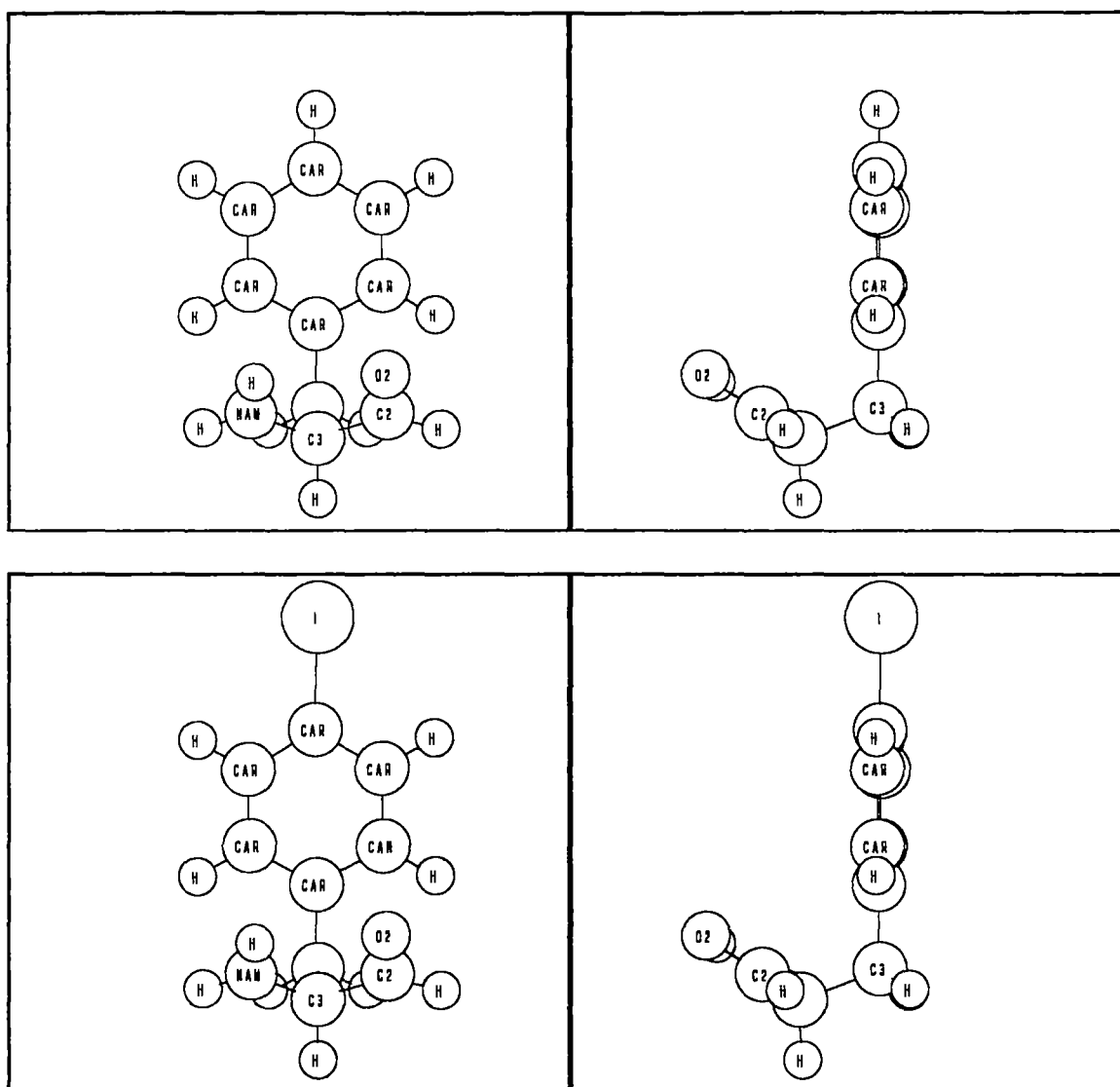


Figure 2. Effet structural de l'addition d'un atome d'iode sur un résidu Phe.

Vue de face (gauche) et de profil (droite) des résidus Phe (haut) et I-Phe (bas). L'addition d'un atome d'iode en position para du noyau aromatique du résidu Phe augmente sa hauteur d'environ 1Å et son épaisseur d'environ 0.25Å.

visant l'amélioration de la technique et son application à diverses catégories de ligands où perdure une absence de radioligand à hautes affinité, sélectivité et radioactivité spécifique deviendrait l'objet majeur du présent ouvrage.

En optimisant la technique, il serait possible de diminuer l'occurrence de sous-produits ce qui faciliterait alors la purification des radioligands tout en permettant d'accroître la radio-activité spécifique des ligands et peut-être d'augmenter le rendement réactionnel. Nous procéderons donc à l'iodation de composés peptidiques et non-peptidiques. Des analogues de l'angiotensine II (Ang) et la vasopressine (VP) seront d'abord marqués. Cela nous permettra de comparer l'efficacité des ligands marqués sur la phénylalanine à ceux déjà existants chez ces familles de composés et communément iodés sur un résidu tyrosine. Nous marquerons par la suite des ligands chez des familles de composés où existe une lacune de radioligands sélectifs à haute radioactivité spécifique. Chez les opiacés, des ligands peptidiques sélectifs pour les récepteurs et seront iodés. Chez les kinines, nous marquerons la bradykinine (BK). Nous vérifierons si la méthode est applicable aux ligands non-peptidiques tels que le sélectif AT₂ PD123177 (BLANKLEY et coll., 1991) et l'opiacé sélectif ICI201163 (BARLOW, 1991). Puisqu'il existe des isotopes de l'iode permettant l'application de techniques d'imagerie de pointe (eg. ¹³¹I), nous ferons une étude préliminaire déterminant la possibilité d'impliquer nos radioligands en imagerie-γ (γ-scanning).

Pour compléter l'étude, nous synthétiserons un nouveau radioligand photoactivable analogue de l'angiotensine II (Ang). Nous introduirons un nouveau

résidu photosensible, le Bpa (benzoyl-phenylalanine) (KAUER et coll., 1986), en position 8 de l'Ang que nous ioderons conventionnellement par la suite. Le Bpa, lorsqu'intégré à la structure de certains peptides, a suscité des rendements d'incorporation pouvant atteindre 80% (BOYD 1991). Comme le montre la figure 3, le Bpa est un peu plus volumineux que le résidu photoactivable bien connu: l'azido-phénylalanine (N_3 -Phe). Contrairement au N_3 -Phe, le Bpa emprunte une voie de photoactivation réversible (fig. 4). Le Bpa non-incorporé peut se régénérer et ainsi reparticiper au processus de photomarquage. Cette particularité explique le haut niveau d'incorporation ligandrécepteur engendré par ce résidu.

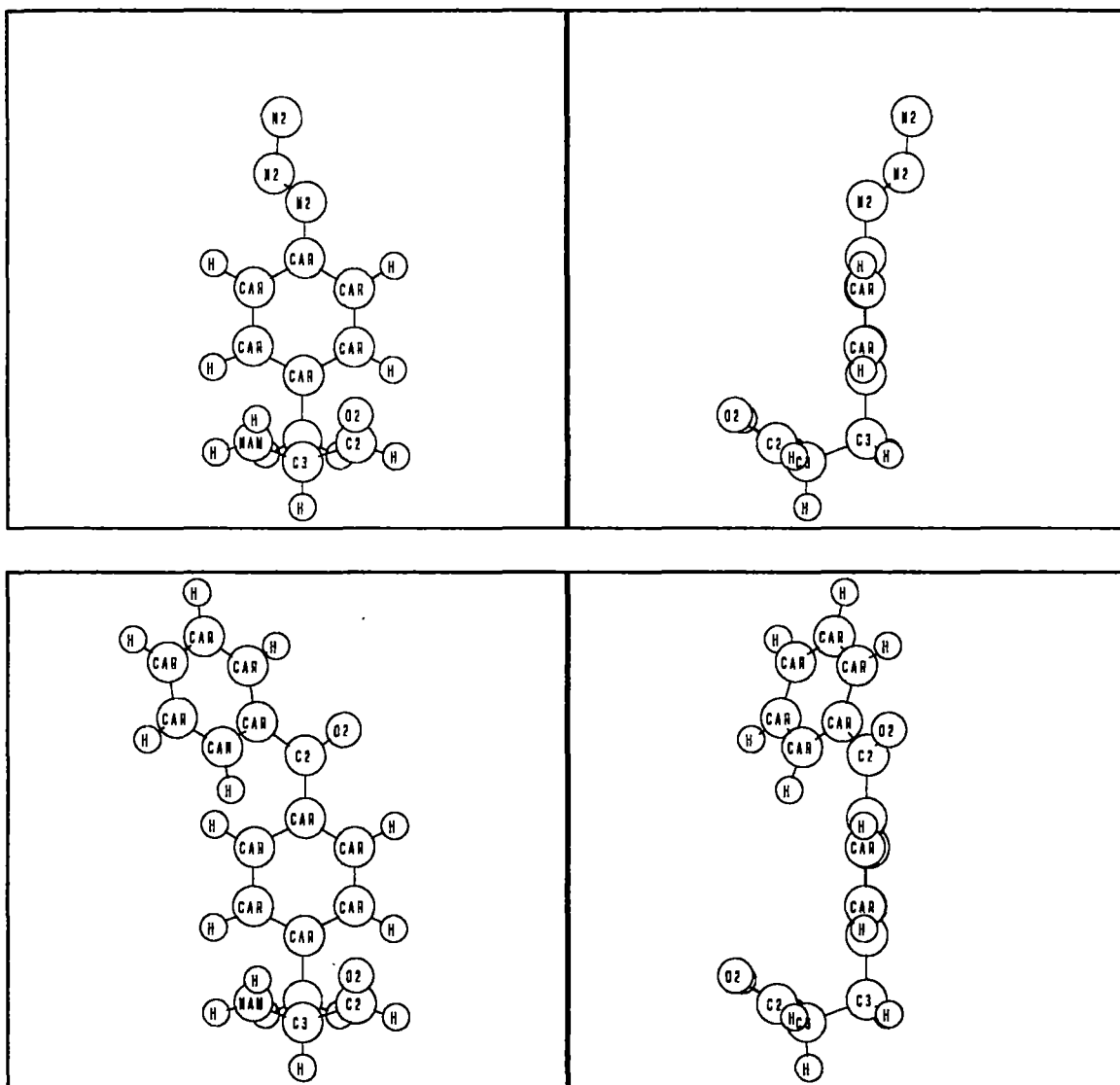


Figure 3. Comparaison des structures des résidus N₃-Phe et Bpa.

Vues de face (gauche) et de profil (droite) des résidus en position 8 de l'Ang . Le N₃-Phe (haut) et le Bpa (bas) sont tous deux des substituants photoactivables utilisés dans la conception d'analogues photosensibles de l'Ang . Le Bpa est le substituant le plus encombrant mais est aussi celui suscitant le meilleur rendement de photomarquage.

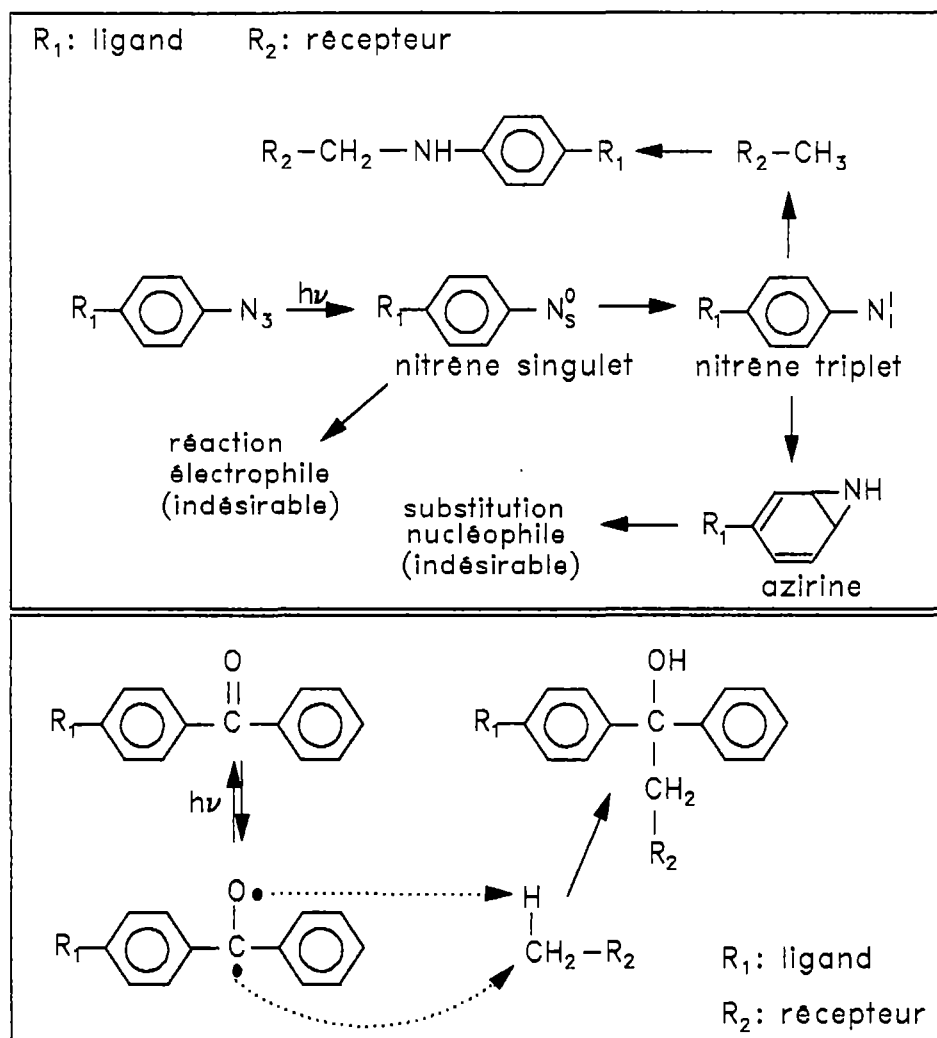


Figure 4. Comparaison des mécanismes de photoactivation entre les résidus N_3 -Phe et Bpa.

Contrairement au N_3 -Phe, le Bpa emprunte une voie de photoactivation réversible. Le ligand-Bpa non-incorporé peut se régénérer et ainsi reparticiper au processus de photomarquage. Cette particularité explique le haut niveau d'incorporation ligand \leftrightarrow récepteur engendré par le Bpa.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

MATÉRIEL

(A) Marquage des radioligands

1- Iodation de l'AngII avec Iodo-Gen.

Iodo-Gen (PIERCE, 28600), Na^{125}I (AMERSHAM, IMS-30), KH_2PO_4 (J.T.BAKER, #3256), tubes en polyéthylène 500 l (SARSTEDT, #72.699)

2- Iodation des composés par la réaction de Gattermann/Sandmeyer.

Seringue 10cc (BECKTON-DICKINSON & CO., 9604), ballon de caoutchouc (ZELLERS, 8361 6607), Poudre de zinc (ALDRICH, 20,998-8), acide sulfamique (FISCHER, A-295), NaNO_2 (Fisher, S-347), H_2SO_4 (ALDRICH, 25,810-5), papier amidon (BDH, 913220), Pd sur charbon (MATHESON, 5865), barreau magnétique miniature (BEL-ART ,F-37121), sonicateur METTLER ME 2.1., vial de verre 5 ml (ALDRICH, Z18,870-0).

3- Purification des composés marqués.

Pré-purification sur SEP-PAK.

Na_2SO_3 (ALDRICH, 25555,6), acétonitrile (ALDRICH, 27,071-7), TFA (ALDRICH, 30,203-1), seringue 3cc (BECKTON-DICKINSON & CO., 9585), cartouche SEP-PAK "Light" C_{18} (WATERS/MILLIPORE), évaporateur SPEED-VAC (SAVANT, SVC10-OH)

Purification par HPLC.

Acétonitrile (ALDRICH, 27,071-7), TFA (ALDRICH, 30,203-1), appareil HPLC de marque WATERS (pompes modèle 6000A et contrôleur modèle 600), colonne de HPLC de marque CSC (phase inerte: Spherisorb C_{18} , 5 μm), détecteur Geiger VICTOREEN #496, collecteur LKB REDIRAC 2112

4- **Analyse chimique par HPLC des composés marqués et analyse des métabolites des composé iodés au ^{131}I excrétés par les lapins.**

Acétonitrile (ALDRICH, 27,071-7), TFA (ALDRICH, 30,203-1), HCl (ALDRICH, 25814,8), NaCl (ALDRICH, 31016,6), système HPLC WATERS 625 (pompe multisolvants modèle et contrôleur modèle POWERLINE), colonne de HPLC WATERS DELTA-PAK 3.9mm x 150mm (phase inerte: HP1 C₁₈, 5 µm, 300Å), détecteur BECKMAN 170, détecteur WATERS M441 UV 214 nm, ordinateur de type AT-386 (20 MHz, co-processeur mathématique, Interface WATERS WD22), logiciel BASELINE/MAXIMA 810 version 3.3 (WATERS/MILLIPORE).

5- **Mesure des coefficients de partition des produits iodés.**

Octanol (ALDRICH, 36056-2), tubes de 15 ml en polypropylène (FALCON, 2059), tubes 12x75mm en polypropylène (FISCHER, 14-961-10), TFA (ALDRICH, 30,203-1).

(B) Préparation des tissus pour les différents essais biologiques.

1- **Préparations microsomales de membranes de cortex surrénalien bovin, de cerveaux de cobayes ou de rats et des couches musculaires d'iléon de cobayes.**

Homogénéisateur en verre KONTES #24, bicarbonate de sodium (FISHER, S-233-500), Tris-HCl (ALDRICH, 85,764-5), TES (N-Tris (hydroxymethyl)methyl-2-aminomethane sulfonic acid) (SIGMA,T-6541), 1,10-phenanthroline (SIGMA,P-9375), sucrose (SIGMA, S-5016), ultracentrifugeuse BECKMAN L8-70, centrifugeuse IEC B-20 et rotor IEC #947, cobayes Hartley mâles 250-350 g, rats Sprague-Dawley mâles 200 g.

Les glandes surrénales ont été fournies par l'abattoir GIROUX (St-Denis de Brompton, Qué.)

2- **Dosage de protéines des préparations microsomales par la méthode de Lowry.**

Na₂CO₃ (FISHER, S-263), NaOH (Fisher, S-318), CuSO₄.5H₂O (J.T.BAKER, #1843), NaK tartrate (FISHER, S-387), réactif Folin-Ciocalteu (SIGMA, F-9252), BSA (SIGMA, A-2153), spectrophotomètre BECKMAN 25

3- **Préparation de l'aorte de lapin et de l'iléon de cobaye pour les essais de tensiométrie.**

NaCl (ALDRICH, 22,351-4), Tris-HCl (ALDRICH, 85,764-5), MgCl₂ (ALDRICH, 20,833-7), α-D-glucose (ALDRICH, 15,896-8), KCl (SIGMA, P-3911), KH₂PO₄ (SIGMA, P-0662), MgSO₄ (SIGMA, M-9397), CaCl₂ (SIGMA, C-4901), NaHCO₃ (SIGMA, S-6014)

(C) Essais biologiques

1- **Essais de liaison des analogues de l'Ang sur membranes de cortex surrénalien bovin.**

NaCl (ALDRICH, 22,351-4), Tris-HCl (ALDRICH, 85,764-5), MgCl₂ (ALDRICH, 20,833-7), B.S.A. (bovine serum albumine, SIGMA, A-7906), bacitracine (SIGMA, B-5150), filtres en fibres de verre de diamètre 24 mm (WHATMAN, 934-AH).

2- **Essais de liaison des analogues de l'enképhaline sur membranes de cerveaux de cobayes et de rats.**

Tris-HCl (ALDRICH, 85,764-5), NaCl (ALDRICH, 22,351-4), P.E.I. (polyethyleneimine, SIGMA, P-3143), filtres en fibres de verre de diamètre 24 mm (WHATMAN, 934-AH).

3- **Essais de liaison des analogues de la bradykinine sur membranes d'iléon de cobayes.**

Polytron, TES (N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminomethane sulfonic acid, T-1375), 1,10 phenanthroline (SIGMA, P-9375), bacitracine (SIGMA, B-5150), captopril (SIGMA), BSA (bovine serum albumine, SIGMA, A-7906), ³H-BK (New-England Nuclear, NET-706), filtres en fibres de verre de diamètre 24 mm (WHATMAN, 934-AH).

4- **Essais tensiométriques des analogues de l'Ang sur aorte de lapin et des analogues de la bradykinine sur l'iléon de cobaye.**

NaCl (ALDRICH, 22,351-4), Tris-HCl (ALDRICH, 85,764-5), MgCl₂ (ALDRICH, 20,833-7), α-D-glucose (ALDRICH, 15,896-8), KCl (SIGMA, P-3911), KH₂PO₄ (SIGMA, P-0662), MgSO₄ (SIGMA, M-9397), CaCl₂ (SIGMA, C-4901), NaHCO₃ (SIGMA, S-6014), Atropine (SIGMA, A-0257), Transducteurs force-déplacement (GRASS, FT 0.3), enregistreur polygraphique (GRASS, modèle 7), tubes à culture en polystyrène 12x75 mm (SIMPORT, T400-3)

5- **Imagerie- des composés marqués au ¹³¹I.**

Xylazine (SIGMA, X-1251), ketamine (ROGARSETIC), pentobarbitone.Na (BDH, K91984), seringues 1cc (BECKTON-DICKINSON, 309602), aiguilles 26½G (BECKTON-DICKINSON, 5111), aiguilles 23G (BECKTON-DICKINSON, 5143), lapins de Nouvelle-Zélande mâles de 1.5 kg, caméra (PICKER DYNA CAMERA 4), collimateur parrallèle PICKER, ordinateur CROMEMCO.

MÉTHODES

(A) Marquage des radioligands

1- **Iodation avec Iodo-Gen.**

25 µl d'une solution 0.4 µg/µl d'Iodo-Gen dans du CH₂Cl₂ sont placés dans un tube microfuge en polyéthylène de 500 µl. On laisse évaporer le CH₂Cl₂ à température de la pièce. On place tout d'abord au fond du tube: 100 µl de KH₂PO₄ 0.5 M pH 7.2 et 2.5-5 nmol de composé à ioder. 1 mCi de Na¹²⁵I (10- 10.5 nmole) est ensuite placé sur la paroi du tube, le tout est centrifugé afin d'homogénéiser le mélange réactionnel et de débiter la réaction. Celle-ci se déroule à 25°C et est arrêtée après 30 minutes par aspiration du mélange dans une seringue où sont déjà présents 250 µl de KI 1M et 250 µl de Na₂SO₃ 1M. L'emploi de ces réactifs nous assure de retrouver le ¹²⁵I libre sous forme de sel. Cela facilite l'évacuation du ¹²⁵I hors de la colonne, diminuant en tout temps les risques de contamination. On procède à la purification.

2- **Iodation des composés par la réaction de Gattermann/Sandmeyer.**

La synthèse des peptides est effectuée de façon coutumière à l'aide du protocole BOC-TFA (MACKIEWICZ et coll., 1987). Le dérivé 4'-nitro phénylalanine étant préparé par la méthode de BERGEL et STOCK (1959). Les peptides sont clivés de la résine avec du HF à 0°C pendant 1 heure, lyophilisés et purifiés par filtration sur gel (G-15) et chromatographie C₁₈ préparative. Les dérivés nitro des peptides sont réduits et diazotés suivant une procédure décrite par LACZCO et ESCHER (1981). On dissout 2.5-5 moles

de dérivé nitrophénylalanine dans 1 ml de H_2SO_4 0.1N et on place le tout dans un vial de verre de 5 ml. On ajoute des traces de catalyseur (Pd sur charbon), on fait le vide dans le vial (fig.5) pour ensuite le mettre sous atmosphère de H_2 pendant 45 minutes. On centrifuge le vial quelques secondes de façon à sédimenter les particules de catalyseur au fond de la bouteille. On décante le surnageant à l'aide d'une pipette de 1 ml et on le place dans un autre vial. On fait un contrôle au HPLC. La prochaine étape est la formation du sel de diazonium. On ajoute 3.0 éq. de NaNO_2 . On fait un contrôle positif en vérifiant la capacité de la solution à oxyder l'iode contenu sur un papier amidon. En déposant quelques l sur le papier on doit apercevoir une coloration noire assez vive. On fait le vide dans le vial pour ensuite le mettre sous atmosphère de N_2 (10 ml) et on laisse réagir 10 minutes à 4°C. Pendant ce temps on peut faire le catalyseur de cuivre (SUEHIRO et coll., 1987). On le prépare par addition de 10-20 mg de poudre de zinc fine à 100-200 l de H_2SO_4 2 N et 400-800 l de CuSO_4 0.5 M. Les grains de cuivre résultants sont lavés deux fois avec de l'eau distillée et déionisée (≈ 1.5 ml par lavage), soniqués pendant 5 minutes, puis décantés et resuspendus dans 1 ml. On détruit l'excès de nitrite en ajoutant 3.5 éq. d'acide sulfamique 1M. On reproède au test du papier amidon: cette fois le test doit être négatif au bout de quelque minutes. 100-500 μg du peptide diazoté en solution sont déposés au fond d'un vial en verre de 5 ml tenu à 4°C. L'iode radioactif (10-20 μl de $\text{Na}^{125}\text{I} \approx 1-2$ mCi ou 65 μl de $\text{Na}^{131}\text{I} \approx 2.5$ mCi) et 250 μl de la suspension de cuivre sont rapidement ajoutés. Le mélange est gardé à 4°C et continuellement agité pendant 10 à 12 heures à l'aide d'un micro agitateur

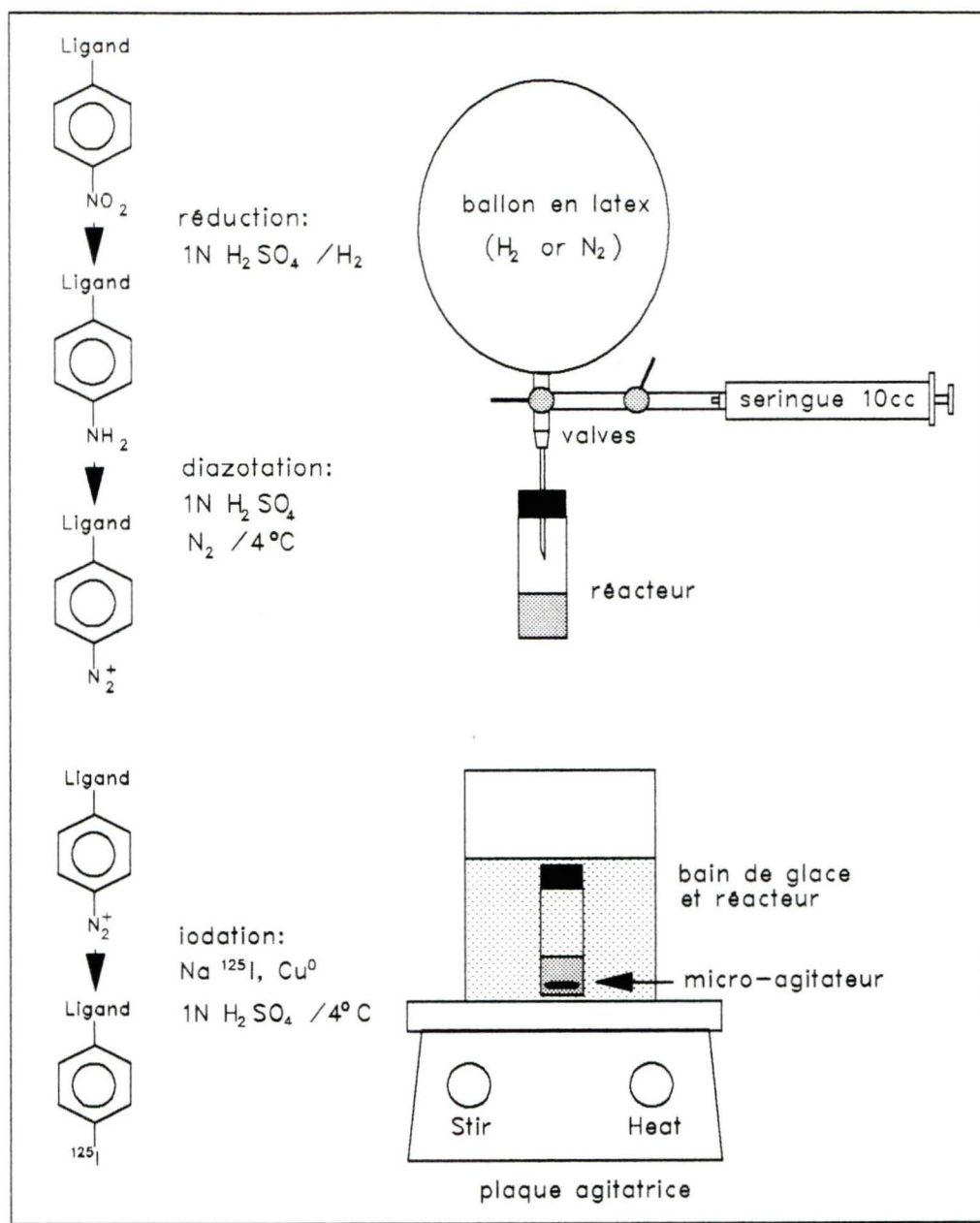


Figure 5. Résumé des manipulations lors dans une iodation par la méthode de Gattermann/Sandmeyer.

Les dérivés nitrophénylalanines sont réduits par hydrogénation catalytique. Les dérivés aminophénylalanines ainsi obtenus sont par la suite soumis à une diazotation sous atmosphère d'azote. La dernière étape est l'iodation proprement dite. C'est une halodéiodation car elle consiste à substituer le groupement diazo en position para du noyau aromatique par un atome d'iode. Le Cu^0 agit comme catalyseur de la réaction. Les dernières étapes se font sur glace parce que les dérivés diazotés sont thermolabiles.

magnétique. Le mélange est tamponné par l'addition d'acétate d'ammonium jusqu'à l'obtention d'un pH environnant 5. On réduira l'iode libre résiduel en ajoutant 1 mg de Na_2SO_3 .

3- **Purification des composés marqués.**

Pré-purification sur SEP-PAK.

Une première purification des composés peut s'effectuer sur SEP-PAK C_{18} à l'aide d'un gradient discontinu d'acétonitrile (TFA 0.1%) variant de 0-75% par intervalles de 5%. On prépare 2 ml de solution $\text{H}_2\text{O}/\text{AcN}/\text{TFA}$ 0.1% aux différentes concentrations. En se servant d'une seringue de 3 ml, on élue le SEP-PAK en conservant l'éluat dans un tube de 12x75 mm. Les fractions sont analysées par HPLC et celles contenant vraisemblablement le composé iodé sont retenues. On évapore l'acétonitrile à l'aide d'un SPEED-VAC. On combine les fractions pour les lyophiliser en présence de NaCl (1 ml d'une solution 0.9%)

Purification par HPLC.

La purification optimale se fait par HPLC (fig.6) avec un gradient 0-90 % AcN/TFA . Le peptide marqué est détecté à l'aide d'un compteur Geiger branché à la sortie de la colonne de HPLC. L'éluat est récolté par fraction d'environ 1 ml. On procède à l'analyse par HPLC des fractions pouvant contenir le composé iodé. Ce sont habituellement celles de plus hauts comptes, exception faite des fractions initiales contenant l'iode non-lié.

4- Analyse chimique par HPLC des composés marqués et analyse des métabolites des composé iodés au ^{131}I excrétés par les lapins.

Cette analyse est faite par HPLC (fig.7) en co-injectant des aliquots d'environ 75,000 CPM avec un analogue iodé non-radioactif. Notons que l'authentification chimique de chaque radioligand demande des co-élutions dans deux systèmes de solvants différents: le premier étant H_2O -AcN(TFA 0.05%) et le second H_2O -AcN(HCl 0.004%). En plus, l'identité des dérivés nitro est vérifiée par spectroscopie de masse à bombardement d'atome à haute vitesse (FAB-mass spectroscopy). Les dérivés iodés non-radioactifs sont préparés suivant une procédure décrite par LACZCO et coll. (1981).

5- Mesure des coefficients de partition à 25°C des produits iodés.

On prépare d'abord des solutions de H_2O saturée en octanol et d'octanol saturé en H_2O . On acidifie les solutions en ajoutant du TFA à concentration finale de 0.1% (v/v). On fait en triplicata ce qui suit. On ajoute environ 100,000 CPM de composé radioactif dans 5 ml de phase aqueuse déjà contenue dans un tube en polypropylène de 15 ml. On ajoute par la suite 5 ml de phase organique puis on agite vigoureusement le tube au vortex pendant 30 secondes. La centrifugation des tubes à basse vitesse assure une séparation rapide et efficace des phases. 5 aliquots de 100 μl de chacune des phases sont prélevés, déposés dans des tubes 12x75 mm et évalués au compteur γ . Le coefficient de partition s'exprime comme le rapport de la concentration du radioligand retrouvée dans la phase organique sur celle retrouvée dans la phase aqueuse.

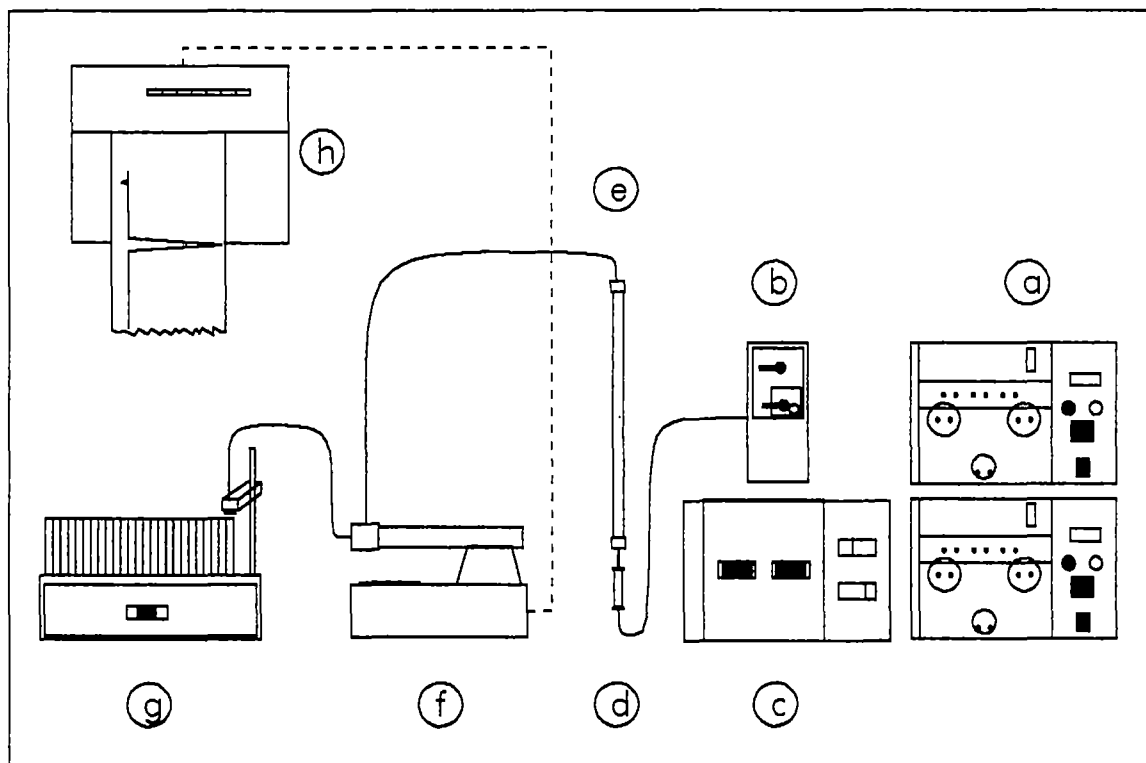


Figure 6. Montage utilisé lors de la purification des produits iodés.

Il s'agit d'un système Waters utilisant deux pompes modèle 501 (a), un injecteur U6K (b), un fabricant de gradient électromécanique (c), une pré-colonne C_8 de 4 cm et une colonne C_{18} de 25 cm. Les produits iodés sont détectés par un compteur Geiger (f) et récoltés dans un collecteur de fractions (g). Le signal du compteur Geiger est capté par un enregistreur analogique (h).

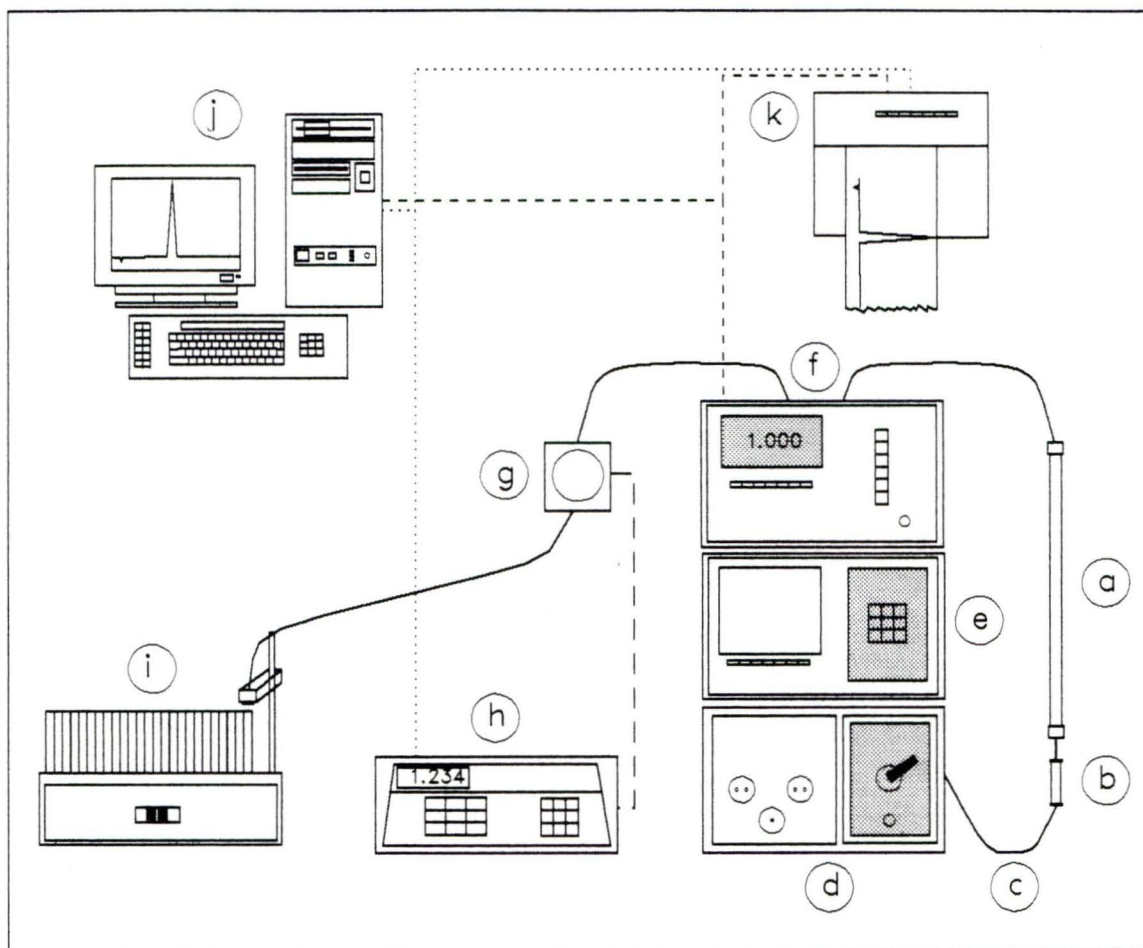


Figure 7. Montage utilisé lors de l'analyse des produits iodés et des métabolites excrétés par les lapins lors des études d'imagerie-.

Il s'agit d'un système Waters 625 fait de matériel inerte permettant l'emploi de solvants très corrosifs tel le HCl. Ses principales composantes sont: colonne DELTA-PAK C_{18} de 20 cm (a), pré-colonne HAMILTON C_8 de 3cm (b), injecteur RHEODYNE 7125 (c), pompe multi-solvants (d), contrôleur de pompe informatisé (e), détecteur UV M441 (f), cellule photodéetectrice (g), contrôleur du détecteur (h) et un collecteur de fractions (i). Les signaux en provenance des détecteurs UV et sont digitalisés par ordinateur (j) et/ou imprimés directement par un enregistreur analogique conventionnel (k).

6-

Nous avons eu recours à une méthode empirique couramment utilisée. Cette mesure s'effectue en comparant les valeurs des rapports B/T (radioactivité spécifiquement liée/quantité totale de radioactivité) d'une expérience de saturation faite avec le radioligand avec les rapports B/T d'une expérience de déplacement du radioligand par un analogue compétiteur non-radioactif. Il faut assumer, qu'à priori, le rapport B/T est le reflet de la concentration totale du(des) ligand(s) utilisé(s) pour cibler une densité donnée de récepteurs dans les deux types d'expériences.

exemple: B/T=0.05 saturation: radioactivité totale = 75,000 dpm
radioactivité liée = 3,750 dpm

B/T=0.05 déplacement: radioactivité totale = 50,000 dpm
radioactivité liée = 2,500 dpm
[compétiteur] = 0.25 nM
= 5×10^{-14} mol/200 μ l

si $[\text{ligand}]_{\text{saturation}} = [\text{ligand}]_{\text{déplacement}}$

$$\begin{aligned} 75,000 \text{ dpm} &= 50,000 \text{ dpm} + 0.25 \text{ nM} \\ 75,000 \text{ dpm} - 50,000 \text{ dpm} &= 0.25 \text{ nM} \\ 25,000 \text{ dpm} &= 0.25 \text{ nM} \end{aligned}$$

pour le ^{125}I : 1 Curie (Ci) = 2.2×10^{12} dpm

$$\begin{aligned} 25,000 \text{ dpm} &= 1.13 \times 10^{-8} \text{ Ci} = 5 \times 10^{-14} \text{ mol} \\ 226 \text{ Ci} &= 1 \times 10^{-3} \text{ mol} = 1 \text{ mmol} \end{aligned}$$

Dans cet exemple, le radioligand aurait une activité spécifique de 226 Ci/mmol.

(B) Préparation des tissus pour les différents essais biologiques.

1- Préparation microsomale de membranes de surrénales de boeuf pour les essais de liaison des analogues de l'Ang (GLOSSMANN et coll., 1974).

Une dizaine de glandes surrénales de boeuf sont dégraissées puis tranchées en deux dans le sens de la longueur. On retire la médullo-surrénale en grattant avec une lame de scalpel. Le cortex est prélevé de la même manière de façon à ne pas entraîner la capsule de tissu conjonctif le recouvrant. Cette capsule rendrait difficile l'homogénéisation du tissu. Le cortex est suspendu dans 100 ml de tampon bicarbonate (BIC: 1 mM, pH 7.4, 4°C). Le matériel est ensuite aminci à l'aide de ciseaux puis homogénéisé avec un homogénéisateur en verre (potter), 6 coups de piston lâche (loose pestle) étant suffisants par fraction. Les fractions homogénéisées sont placées dans deux bouteilles de 50 ml et centrifugées à basse vitesse pendant 10 min. (900 x g). Les organites cellulaires précipitent, laissant les organites de faible densité en solution, membranes y compris. Le surnageant est centrifugé à plus haute vitesse (25000 x g) pendant 20 min. Les culots riches en membranes sont cumulés et resuspendus dans 10 à 15 ml de BIC. Le tout est fractionné par aliquots de 200 µl et conservé à basse température (-80 à -100°C).

2- Préparation microsomale de membranes de cerveaux de cobayes ou de rats pour les essais de liaison des ligands des récepteurs opiacés (PASTERNAK et coll., 1975).

Les cobayes ou les rats sont décapités et les cerveaux sont rapidement

prélevés. Les cervelets sont excisés puisqu'ils ne contiennent pas une quantité significative de récepteurs opiacés. On immerse les cerveaux dans 30 volumes de tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7.7 à 25°C; tampon de base) pour ensuite les homogénéiser à l'aide d'un homogénéisateur Dounce. L'homogénat est centrifugé à 50,000 x g pendant 15 min. et le culot resuspendu dans le tampon de base. La resuspension est incubée à 37°C pendant 30 minutes et recentrifugé par la suite. Le nouveau culot est resuspendu dans 100 volumes de le tampon d'incubation approprié.

3- **Préparation microsomale de membranes d'iléon de cobaye pour les essais de liaison des analogues de la bradykinine.(RANG, 1964)**

Les animaux adultes de sexe quelconque sont sacrifiés et leurs iléons sont immédiatement prélevés. On prend soin d'enlever la muqueuse en la grattant à l'aide d'un scalpel. Les couches musculaires sont homogénéisées à l'aide d'un Polytron dans un tampon TES pH 6.8, contenant du 1,10-phenantroline 1 mM et du sucrose 0.25 M. L'homogénat est filtré par deux couches de coton à fromage, centrifugé à 50,000 x g pendant 20 min. et suspendu dans du tampon sans sucrose donnant une solution dont la concentration en protéines s'élève à environ 4 mg/ml. Le contenu en protéine est évalué par la méthode de Lowry.

4- **Dosage protéique des membranes par la méthode de Lowry (LOWRY et coll., 1951).**

La nature et la composition des réactifs utilisés sont: Réactif A, Na_2CO_3 2% dans NaOH 0.1 N (A). Réactif B, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5 % dans NaK Tartrate 1%.

Réactif C, mélange de 50 ml de A et 1 ml de B. Réactif D, réactif Folin 1N. Une courbe standard est préalablement constituée avec des concentrations de BSA variant de 0 à 200 µg/ml. On dilue un aliquot membranaire avec du BIC dans un rapport 1:9. La solution obtenue est rediluée dans certains rapports (1/2, 1/4, etc..) de façon à pouvoir interpoler effectivement la concentration à partir de la courbe standard. Les réactifs sont ajoutés dans l'ordre: 1 ml de solution de membranes diluées (ou de BSA pour la courbe standard) et 5 ml de réactif C. On laisse réagir 10 min. à température de la pièce. 500 µl de réactif D est ensuite ajouté. On laisse de nouveau réagir à température de la pièce, cette fois-ci pendant 30 min. Les lectures d'absorbance sont faites à une longueur d'onde voisine de 500 nm.

5- Préparation des bandelettes d'aorte de lapin pour les essais tensiométriques des analogues de l'Ang (FURCHGOTT et coll., 1952).

Le milieu d'incubation utilisé dans cette partie expérimentale est une solution de Krebs pH 7.4. Il est composée de NaCl 117.5 mM, KCl 4.7 mM, KH_2PO_4 1.18 mM, MgSO_4 1.18 mM, CaCl_2 2.5 mM, NaHCO_3 25.0 mM et glucose 5.0 mM. Les lapins utilisés sont albinos, des deux sexes et pèsent entre 1.5 et 2.5 kg. Ils sont sacrifiés puis saignés par section des artères carotides. Après laparotomie, l'aorte thoracique est rapidement prélevée et placée dans du Krebs tenu à 4°C. Après avoir retiré la graisse, on taille l'aorte en hélice de façon à obtenir une bande d'environ 4 mm de largeur. Cette bande est ensuite sectionnée en 4 segments de 2.5 cm de longueur. Chaque bandelette est fixée par ses extrémités au fond d'un bain à perfusion et au réceptacle

d'untransducteur de tension à l'aide de fil chirurgical et de crochets en acier inoxydable (fig.8). Il est à noter que les bains sont perfusés avec du Krebs tenu à 37°C dans lequel barbotte un mélange gazeux de 95% O₂ et 5% CO₂. Une tension d'environ 2 g est appliquée sur chaque bandelette. On maintient cette tension par l'intermédiaire d'une vis micrométrique jusqu'à l'équilibre. Celui-ci est atteint en approximativement heure lorsque l'on réajuste la tension par intervalle de 5 minutes. Ensuite, les bains sont remplis avec du Krebs frais.

6- Préparation des anneaux d'iléon de cobaye pour les essais tensiométriques des analogues de la bradykinine.

Le milieu d'incubation utilisé dans cette partie expérimentale est une solution de Krebs pH 7.4. Il est composée de NaCl 117.5 mM, KCl 4.7 mM, KH₂PO₄ 1.18 mM, MgSO₄ 1.18 mM, CaCl₂ 2.5 mM, NaHCO₃ 25.0 mM et glucose 5.0 mM. Les cobayes utilisés sont albinos, mâles de préférence et pèsent entre 300 et 450 g. Ils sont sacrifiés par dislocation des vertèbres cervicales. Après laparotomie, l'iléon est rapidement prélevé et placé dans du Krebs tenu à 4°C. Après l'avoir lavé avec une seringue de façon à enlever toute trace d'excrément, on le taille en anneaux d'environ 5mm de largeur. Chaque anneau est fixé à l'aide de petits crochets d'acier inoxydable par ses extrémités de façon à ne pas obstruer la lumière. L'anneau est placé au fond d'un bain à perfusion et au receptacle d'un transducteur de tension à l'aide de fil chirurgical (fig.8). Notons que les bains sont perfusés avec du Krebs tenu à 37°C dans lequel barbotte un mélange gazeux O₂ 95% et CO₂ 5%. Une tension d'environ 2 g est appliquée sur chaque anneau. On maitient cette

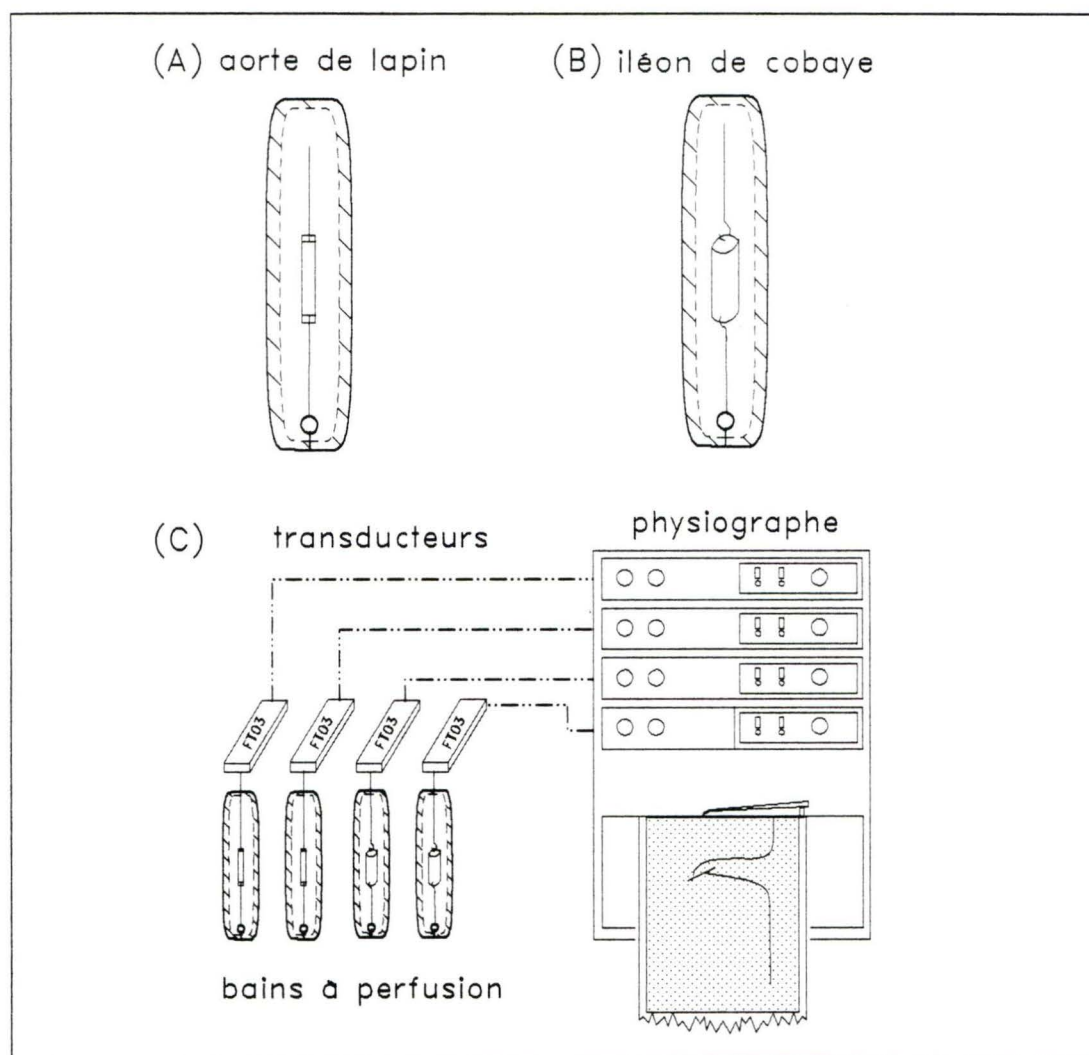


Figure 8. Montage des tissus pour les essais de tensiométrie avec l'aorte de lapin et l'iléon de cobaye.

L'aorte de lapin (a) et l'iléon de cobaye (b) sont préparés, suspendus et baignés dans une solution de Krebs tel que décrit précédemment. Les changements de tension produits par l'application des agonistes sont perçus par des transducteurs de force et enregistrés par un physiographe (c). Les courbes concentration-réponses sont utilisées pour évaluer l'affinité apparente de chaque composé.

tension par l'intermédiaire d'une vis micrométrique jusqu'à l'équilibre. Celui-ci est atteint en approximativement une heure lorsque l'on réajuste la tension par intervalle de 5 minutes. Ensuite, les bains sont remplis avec du Krebs frais auquel on a ajouté de l'atropine pour empêcher toute contraction spontanée du tissu médiée par l'acétylcholine.

(C) Essais biologiques

1- Essais de liaison des analogues de l'Ang sur membrane de cortex surrénalien bovin.

Le tampon d'incubation est composé de: Tris/HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 100 mM, de $MgCl_2$ 5 mM et de BSA 2 mg/ml. La solution de rinçage est de nature semblable exception faite du BSA. Les séries de tubes à essais (polycarbonate, 12x75 mm) sont composés tel que décrit plus bas suivant le type d'expérience que l'on effectue (saturation ou déplacement). La réaction débute avec l'addition des membranes et dure 45 min. à 22°C. Celle-ci est arrêtée par addition de 3 ml de solution de rinçage (pH 7.4,) et filtration du contenu du tube sur des filtres en fibre de verre. Le tube est alors rincé 3 fois de cette façon. Les filtres asséchés sont déposés dans des tubes neufs et comptés au compteur . Dans les expériences de saturation, on compose les tubes avec des quantités croissantes d'Ang marquée. La liaison non-spécifique est évaluée en présence d'une concentration saturante d'Ang non-marquée (10^{-6} M). Pour les mesures de liaison totale on ajoute aux tubes dans l'ordre: 50 μ l d'hormone marquée (0 à 10^6 CPM), 50 μ l de tampon d'incubation et 100 μ l de membranes (25-50 g de prot.). On mesure la liaison non-spécifique en

substituant le 50 µl de tampon par 50 µl d'hormone standard (Sar¹,Val⁵,D-Phe⁸)Ang non-marquée ($\approx 10^{-6}$ M). Lors des études de déplacement, on compose les tubes avec une quantité fixe d'hormone marquée en compagnie de quantités croissantes d'hormone non-marquée à tester. A chaque série de tubes (duplicata) sont ajoutés dans l'ordre: 50 µl d'hormone marquée ($\approx 50\,000$ CPM), 50 µl d'hormone non-marquée (0 à 10^{-6} M) et 100 µl de membranes (25-50 µg de prot.). Le reste des manipulations est le même.

2- Essais de liaison des analogues opiacés sur membranes de cerveaux de rats ou de cobayes.

Les conditions expérimentales sont les mêmes quelque soit le traceur. Les essais de liaison à l'équilibre sont produits dans des tubes 12x75mm avec un volume total de 500 µl, à 22°C pendant 60 minutes (3 heures pour le ¹²⁵I-DPDP). Dans les études de saturation, les membranes (0.25-0.50 mg protéine/tube) sont incubées avec des concentrations croissantes de traceur (0 à 1 nM) alors qu'une concentration fixe d'environ 50-100 pM est utilisée lors des études de déplacement. Le tampon d'incubation est constitué de Tris/HCl 25 mM pH 7.4, avec ou sans NaCl 50 mM, BSA 2 mg/ml et bacitracine 0.2 mg/ml. L'incubation est arrêtée par filtration sur filtres de fibre de verre pré-traités avec une solution de polyéthylèneimine 0.1%(p/v). Les filtres sont rincés avec 3 ml de tampon Tris/HCl 25 mM pH 7.4 (sans BSA ni bacitracine) froid (gardé sur glace) et sont ensuite transférés dans des tubes 12x75mm en polypropylène. La liaison non-spécifique est déterminée en

présence de naloxone 1 μ M.

3- **Essais de liaison des analogues de la bradykinine sur membranes d'iléon de cobaye.**

Les conditions expérimentales sont les mêmes quelque soit le traceur: ^3H -BK ou ^{125}I -BK. Les essais de liaison à l'équilibre sont produits dans des tubes 12x75mm avec un volume total de 2 ml, à pendant 60 minutes. Dans les études de saturation, les membranes (0.2-0.3 mg protéine/tube) sont incubées avec des concentrations croissantes de traceur alors qu'une quantité fixe d'environ 20-30 pM est utilisée lors des études de déplacement. Le tampon d'incubation est constitué de TES 25 mM pH 6.8, 1,10-phenanthroline 1 mM, bacitracine 140 g/ml, captopril 10 μ M, dithiotreitol 1 mM et BSA 0.1%. L'incubation est arrêtée par filtration sur filtres de fibre de verre pré-traités avec une solution de polyéthylèneimine 0.1%(p/v). Les filtres sont rincés avec 3 ml de tampon TES 10 mM pH 6.8 froid (gardé sur glace) et son ensuite transférés soit dans des vials à scintillation (^3H -BK) soit dans des tubes 12x75mm en polypropylène (^{125}I -BK). La liaison non-spécifique est déterminée en présence de 1 μ M de BK ou de I-BK tel que spécifié.

4- **Essais tensiométriques des analogues de l'Ang sur bandelettes d'aorte de lapin et des analogues de la bradykinine sur anneaux d'iléon de cobaye.**

Les tissus sont suspendus tel que décrit précédemment et baignés dans une solution de Krebs. Dans le cas de la bradykinine et ses analogues, on ajoute de l'atropine pour écarter toute contraction spontanée de l'iléon engendré par l'acétylcholine via les récepteurs muscariniques. Les changements de tension

produits par l'application des agonistes sont perçus par des transducteurs de force et enregistrés par un physiographe. Les courbes concentration-réponses sont utilisées pour évaluer l'affinité apparente de chaque composé. Cette mesure, appelée le pD_2 , s'exprime comme le logarithme négatif de la concentration d'un agoniste pouvant susciter 50% de la réponse maximale (ARIENS et coll., 1957). L'affinité relative des antagonistes est mesurée via leur pA_2 . Cette mesure s'exprime comme le logarithme négatif de la concentration d'un antagoniste pouvant réduire l'effet d'une double dose d'agoniste en celui d'une simple dose (SCHILD, 1947). On mesure aussi l'activité intrinsèque (α^E) des agonistes, en faisant le rapport de la réponse maximale engendrée par un agoniste à celle produite par un agoniste standard: l'Ang ou la bradykinine par exemple. La réponse maximale est obtenue lorsque l'application de doses subséquentes d'agoniste ne suscite plus d'augmentation de la réponse biologique (ARIENS, 1964)

5- **Imagerie- des composés iodés au ^{131}I et des marqueurs tissulaires injectés chez des lapins anesthésiés.**

Composés marqués au ^{131}I

Les lapins sont anesthésiés avec un mélange de xylazine (5 mg/kg) et de kétamine (25 mg/kg) par injection intra-musculaire. 50 à 200 μCi des composés radioactifs et non-radioactifs sont injectés par la veine marginale de l'oreille. On procède aux enregistrements des images aux temps suivants: 1 minute, 1 heure, 3 heures, 6 heures, 12 heures et 24 heures post-injection. Les temps d'enregistrements pour chaque image varient de 5 à 10 minutes. On

récolte l'urine (si disponible) après 1, 3, 6 et 12 heures. Les fèces sont récoltées après 24 heures. Le lapin est sacrifié par surdose de pentobarbital (500 mg/kg) injecté aussi dans la veine marginale. La carcasse est gardée 10-15 jours dans un endroit approprié (congélateur destiné à la radioactivité) de façon à ce qu'elle ait une activité inférieure à un seuil limite fixé à 50 μ Ci.

Marqueurs tissulaires

La visualisation du **pool sanguin** se fait par marquage des globules rouges au ^{99m}Tc -pertechnate à l'aide d'une méthode semblable à PAVEL et coll. (1977). 500 μ l d'une solution de fluorure stanneux (0.67 mg/ml)-medronate de sodium (1.1 mg/ml) est injecté au lapin par une veine marginale de l'oreille. 20-30 minutes plus tard, 500-750 μ l de sang sont prélevés à l'aide d'une seringue héparinisée. 5 mCi de ^{99m}Tc -pertechnate et 3 ml de saline stérile sont ajoutés au sang et le tout incubé à 37°C pendant 10 min. dans un tube à centrifuger stérile. Le tube est ensuite centrifugé quelques minutes à 500 x g. On décante le surnageant et resuspend le culot de globules rouges à l'aide 3 ml de saline. Afin d'éliminer le plus de ^{99m}Tc -pertechnate libre, le cycle centrifugation-resuspension est repris 2-3 fois. Finalement le dernier culot est resuspendu dans 500 μ l de saline et injecté au lapin par une veine marginale. Les images sont prises à 2.5, 5, 15 et 60 min. post-injection. Les **os**, le **foie** et les **reins** sont visualisés à l'aide de ^{99m}Tc -pyrophosphate injecté par la veine marginale d'une oreille. Des images sont prises à 2 min. (foie et reins) et 45 min. (os) post-injection.

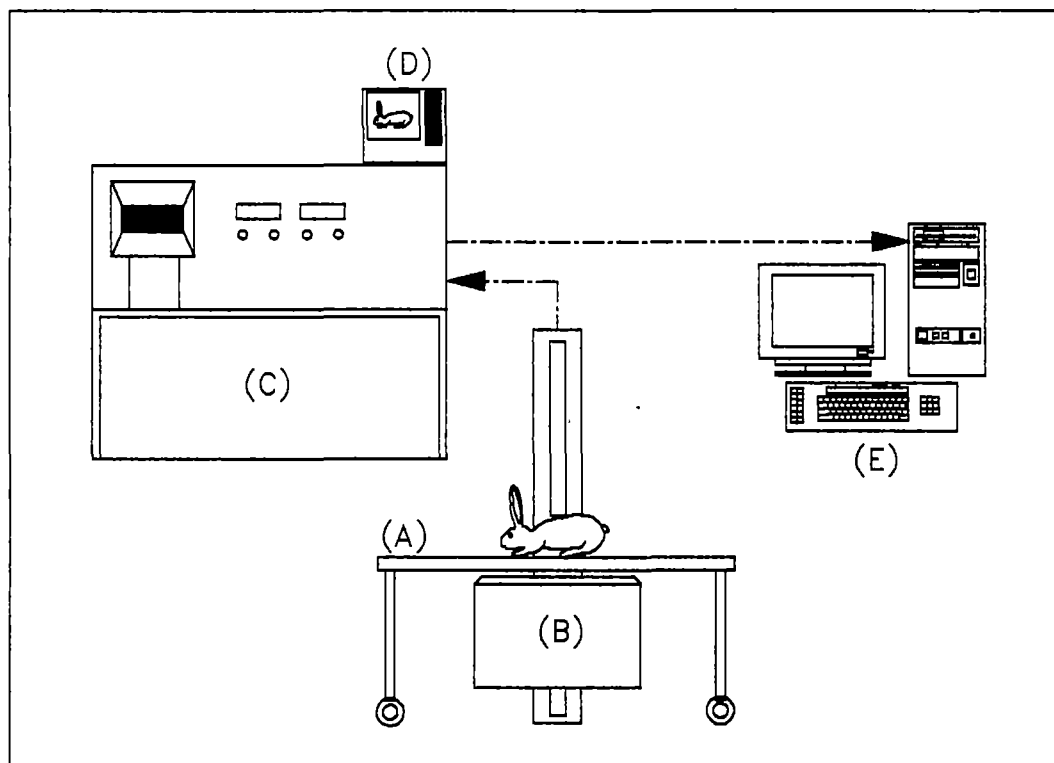


Figure 9. Système d'analyse scintigraphique.

Le lapin est déposé sur une civière (A). Les rayons passent par le collimateur parallèle de la caméra (B). Les signaux en provenance de la caméra sont digitalisés et traités par l'ordinateur du pupitre de commande (C). Il est possible de voir en temps réel une image statique ou dynamique de l'enregistrement à l'aide d'un oscilloscope (D). Les résultats ont été enregistrés par un système informatisé de traitement d'image (E).

RÉSULTATS

(A) Structure des composés étudiés et identification des sites d'iodation.

Les ligands présentés au tableau 1 ont été choisis parmi 4 familles de composés bioactifs: l'Ang, l'enképhaline, la bradykinine et la vasopressine. Le [Sar¹,Val⁵,NO₂-Phe⁸]Ang et le [Sar¹,Val⁵,Bpa⁸]Ang sont deux analogues peptidiques de l'Ang. Le premier sera iodé sur le résidu NO₂-Phe⁸ par la réaction de Gattermann/Sandmeyer et le second par voie conventionnelle sur le résidu Tyr en position 4. Le PD123177, un composé sélectif pour le récepteur AT₂, sera marqué via sa fonction aniline par la réaction de Gattermann/Sandmeyer. Tous les analogues de l'enképhaline seront marqués par la réaction de Gatterman/Sandmeyer. Les analogues peptidiques le seront à partir de résidus NO₂-Phe. Il est à noter que le [D-Pen^{2,5},NO₂-Phe⁴] enképhaline est un composé cyclique. La fonction aniline sera le site d'iodation de l'analogue non-peptidique sélectif pour le récepteur: le ICI-201163. Les analogues de la bradykinine et de la vasopressine seront iodés par la réaction de Gattermann/Sandmeyer sur leurs résidus NO₂-Phe respectifs. L'analogue de la vasopressine est un composé cyclique.

(B) Calibration du système d'acquisition des signaux U.V. et γ .

L'élution d'un sel radioactif (Na¹²⁵I) et d'un sel non-radioactif (KI) (fig. 10) nous permet d'établir un facteur de correction entre les temps de d'enregistrement des signaux en provenance des détecteurs U.V. et γ . Les deux détecteurs sont reliés par un tube d'environ 80 μ l de volume ce qui provoque un décalage de 5 secondes entre les temps d'enregistrements des deux types de signaux. Lors de l'analyse des

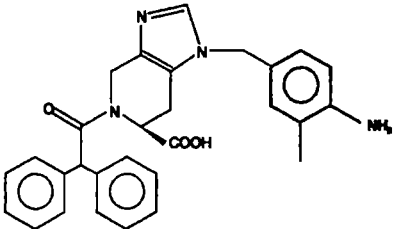
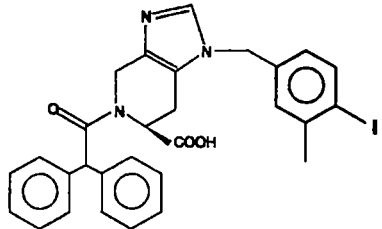
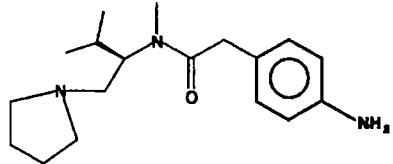
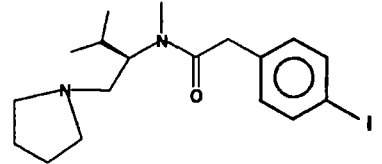
Composé	Structure initiale	Structure iodée
Ang	Sar-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-(NO ₂)Phe	Sar-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-(I)Phe
Bpa-Ang	Sar-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Bpa	Sar-Arg-Val-(I)Tyr-Val-His-Pro-Bpa
PD123177		
Enk	Tyr-Gly-Gly-(NO ₂)Phe-Leu	Tyr-Gly-Gly-(I)Phe-Leu
DPDP	Tyr-D-Pen-Gly-(NO ₂)Phe-D-Pen	Tyr-D-Pen-Gly-(I)Phe-D-Pen
DALDA	Tyr-D-Arg-(NO ₂)Phe-Lys-NH ₂	Tyr-D-Arg-(I)Phe-Lys-NH ₂
YaFF	Tyr-D-Ala-Phe-(NO ₂)Phe-NH ₂	Tyr-D-Ala-Phe-(I)Phe-NH ₂
ICI-201163		
BK	Arg-Pro-Pro-Gly-(NO ₂)Phe-Ser-Pro-Phe-Arg	Arg-Pro-Pro-Gly-(I)Phe-Ser-Pro-Phe-Arg
VP	DMPP-Tyr-(NO ₂)Phe-Val-Asp-Cys-Pro-Lys-D-Tyr	DMPP-Tyr-(I)Phe-Val-Asp-Cys-Pro-Lys-D-Tyr

Tableau 1. Structure des composés marqués.

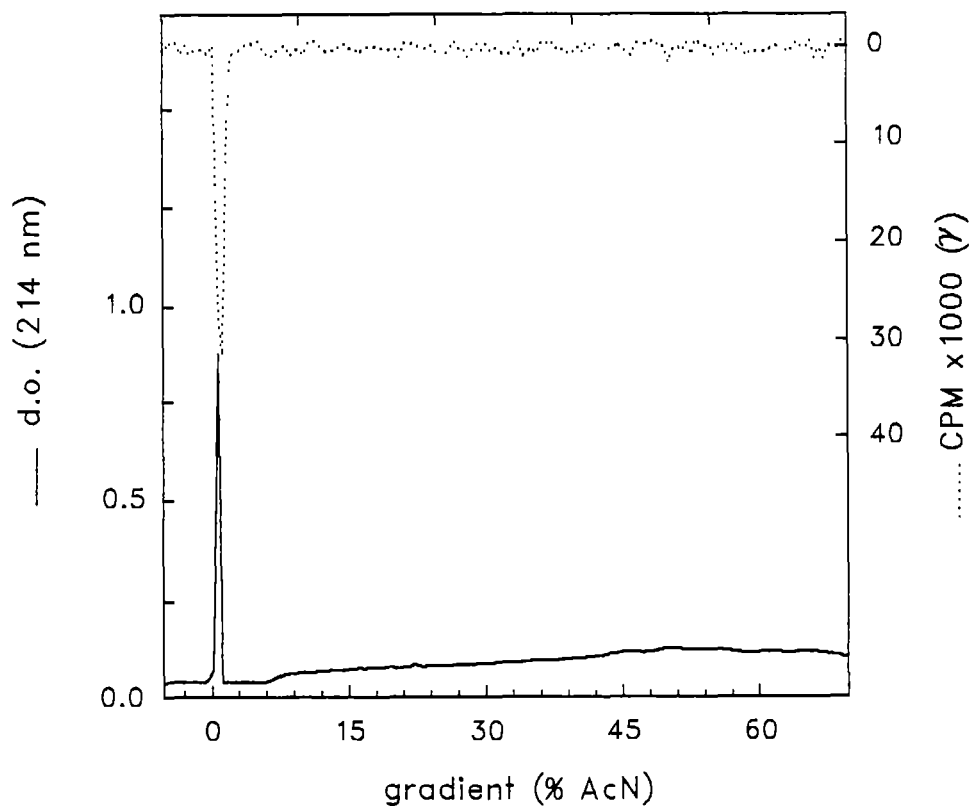


Figure 10. Calibration du système d'acquisition des signaux U.V. et γ .

Profil d'élution en HPLC d'un mélange de KI (10 μ l de solution 1M) et de Na¹²⁵I (75000 CPM). La densité optique et le niveau de radioactivité sont représentés en ordonnée alors que le gradient d'acétonitrile est indiqué en abscisse. Un faible décalage de 5 secondes apparaît entre le pic de KI (d.o.) et celui de Na¹²⁵I (γ). Ce décalage est dû au passage de la solution dans un tube d'environ 80 μ l de volume reliant les deux détecteurs.

chromatographes, il faudra évidemment tenir compte de ce décalage.

(C) Variation de la rétention d'un composé sur une colonne C₁₈ en fonction de l'environnement ionique.

A la figure 11, on s'aperçoit que des composés différents sont élués de façon différentes suivant la composition du milieu utilisé. Lorsqu'on co-injecte du [Sar¹,Val⁵,D-Phe⁸]Ang et du [Sar¹,¹²⁵I-Tyr⁴,Val⁵,D-Phe⁸]Ang dans un système de solvants contenant du TFA, nous observons deux pics puisque les produits diffèrent chimiquement et éluent séparément. Nous observons le même phénomène lorsque le système de solvants contient du HCl et du NaCl à la place du TFA. Les analogues iodé et non-iodé démontrent une plus forte rétention lorsque le TFA est employé comme tampon.

Des profils d'élution en HPLC d'un mélange de [Sar¹,Val⁵,I-D-Phe⁸]Ang et de [Sar¹,Val⁵,¹²⁵I-D-Phe⁸]Ang sont présentés à la figure 12. Deux co-élutions ont été faites avec des gradients d'acétonitrile où le contenu en ions diffère. On s'aperçoit que des composés identiques (analogues iodés de l'Ang) co-éluent identiquement quelque soit le milieu utilisé. Toutefois, les analogues iodé et non-iodé démontrent une plus forte rétention lorsque le TFA est employé comme tampon. Cette méthode est employée pour corroborer l'identité chimique des espèces iodées radioactives et non-radiocatives. Une parfaite co-élution dans deux systèmes de solvants indique une identité chimique.

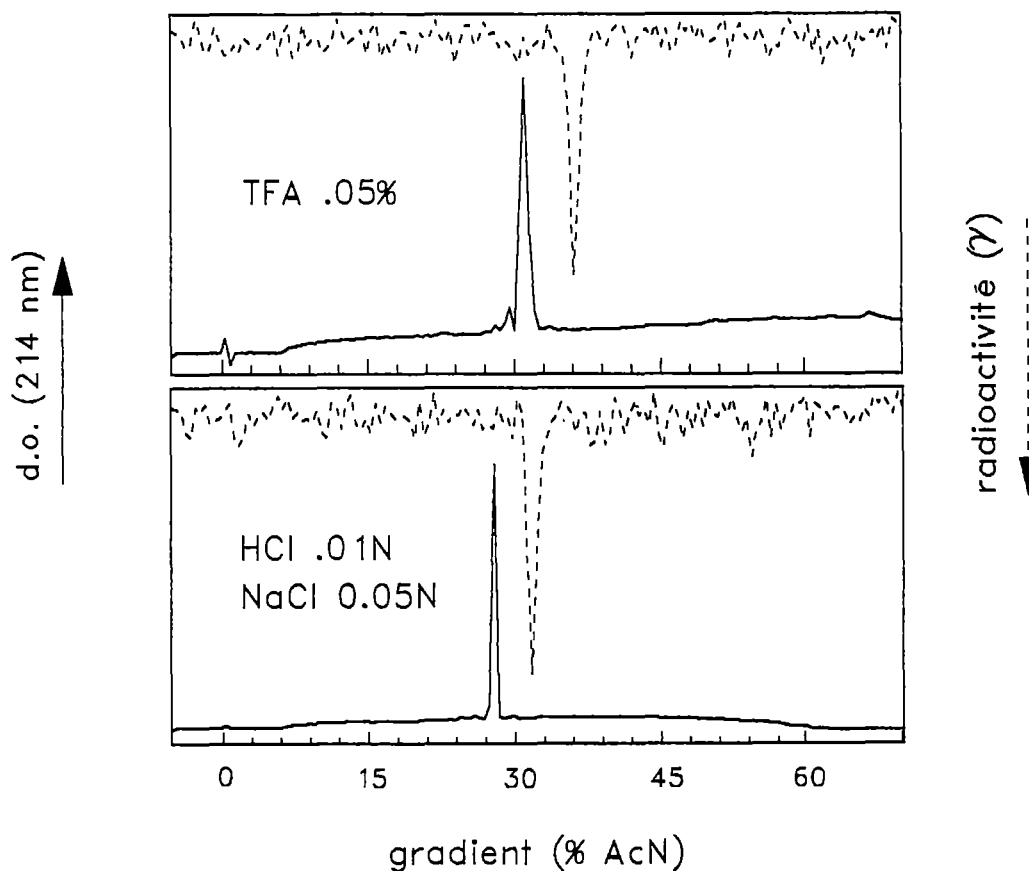


Figure 11. Variation de la rétention d'un composé sur une colonne C_{18} en fonction de l'environnement ionique.

Profil d'élution en HPLC d'un mélange de $[Sar^1, Val^5, D-Phe^8]Ang$ ($25 \mu l$ d'une solution $10^{-3} M$) et de $[Sar^1, ^{125}I-Tyr^4, Val^5, D-Phe^8]Ang$ (25000 CPM). La densité optique et le niveau de radioactivité sont représentés en ordonnée alors que le gradient d'acétonitrile est indiqué en abscisse. Deux co-injections ont été faites avec des gradients d'acétonitrile où le contenu en ions diffère. On s'aperçoit que des composés différents sont élués de façon différentes suivant le milieu utilisé. Les analogues iodé et non-iodé démontre une plus forte rétention lorsque le TFA est utilisé.

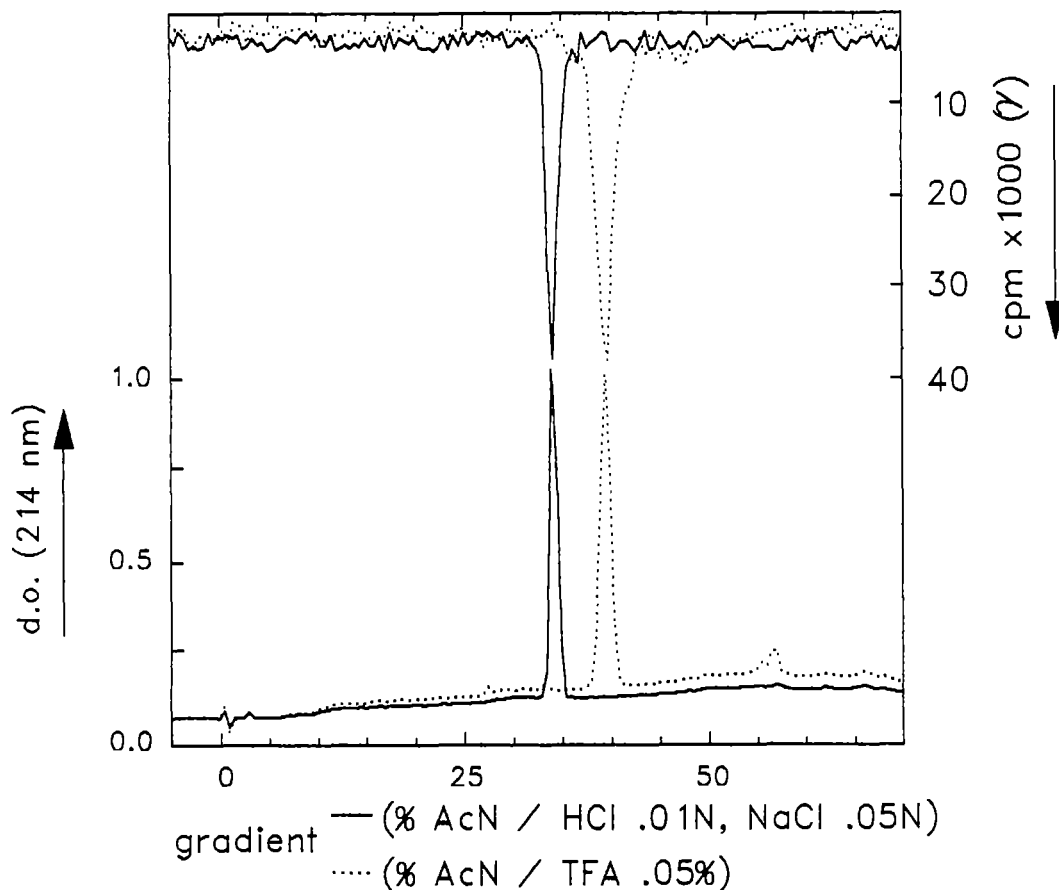


Figure 12. Variation de la rétention d'un composé sur une colonne C_{18} en fonction de la composition ionique de l'éluant.

Profil d'élution en HPLC d'un mélange de $[Sar^1, Val^5, I-D-Phe^8]Ang$ (25 μl d'une solution $10^{-3}M$) et de $[Sar^1, Val^5, ^{125}I-D-Phe^8]Ang$ (25000 CPM). La densité optique et le niveau de radioactivité sont représentés en ordonnée alors que le gradient d'acétonitrile est indiqué en abscisse. Deux co-élutions ont été faites avec des gradients d'acétonitrile où le contenu en ions diffère. On s'aperçoit que des composés identiques co-éluent quelque soit le milieu utilisé. Toutefois, les analogues iodé et non-iodé démontrent une plus forte rétention lorsque le TFA est employé. Cette méthode est utilisée pour corroborer l'identité chimique des espèces iodées radioactives et non-radiocatives. Une parfaite co-élution dans deux systèmes de solvants est une forte indication d'une similitude chimique.

(D) Iodation du [Sar¹, Val⁵, NO₂-D-Phe⁸]Ang (NO₂-Ang) par la réaction de Gatterman/Sandmeyer et essais de liaison du radioligand obtenu.

Le marquage du NO₂-Ang a permis l'obtention de [Sar¹, Val⁵, ¹²⁵I-D-Phe⁸]Ang (¹²⁵I-Ang) avec un rendement moyen de 48%. La figure 13 nous présente un profil typique d'élution du mélange réactionnel (γ) et de certains analogues de l'Ang. Une espèce radioactive co-élue avec le [Sar¹, Val⁵, I-D-Phe⁸]Ang (I-Ang), il s'agit vraisemblablement de ¹²⁵I-Ang. Un échantillon de la fraction contenant le ¹²⁵I-Ang a été co-injecté en présence de I-Ang dans deux systèmes de solvants (TFA et HCl-NaCl) et dans chaque cas, une co-élution a été obtenue (fig.12). L'analyse des produits de réduction d'un mélange de I-Ang et de ¹²⁵I-Ang nous permet d'observer la production d'Ang (à partir du I-Ang) et de ¹²⁵I libre (fig. 14). Ces observations constituent une solide preuve de l'obtention du produit correctement iodé. Le log du coefficient de partition du ¹²⁵I-Ang se chiffre à 1.2. Des essais de liaison ont été entrepris avec cette fraction et des résultats typiques sont présentés à la figure 15. Le ¹²⁵I-Ang est déplacé par le [Sar¹, Val⁵, D-Phe⁸]Ang (D-Phe-Ang) sur des membranes de cortex surrénalien bovin. En utilisant 50 µg de protéines, la liaison totale fut d'environ 25% dont 14-16% était spécifique. La liaison du ¹²⁵I-Ang aux récepteurs de l'Ang est saturable à en juger par la courbe de Scatchard présentée en médaillon. A l'aide de ce tracé, le radioligand ne semble toucher qu'une seule population de récepteurs. La liaison totale (B.max.) s'établit entre 0.55-0.70 pmol/mg protéine et la constante d'affinité (Kd) du radioligand fut évaluée à 1.0±0.5 nM (voir annexe 1a). Les expériences de déplacements montrent une variation de l'IC₅₀ du compétiteur non-radioactif (D-Phe-Ang) en fonction du traceur utilisé. Quand le [Sar¹, ¹²⁵I-Tyr⁸, Val⁵, D-Phe⁸]Ang est utilisé le IC₅₀ du D-Phe-Ang est d'environ 3 nM

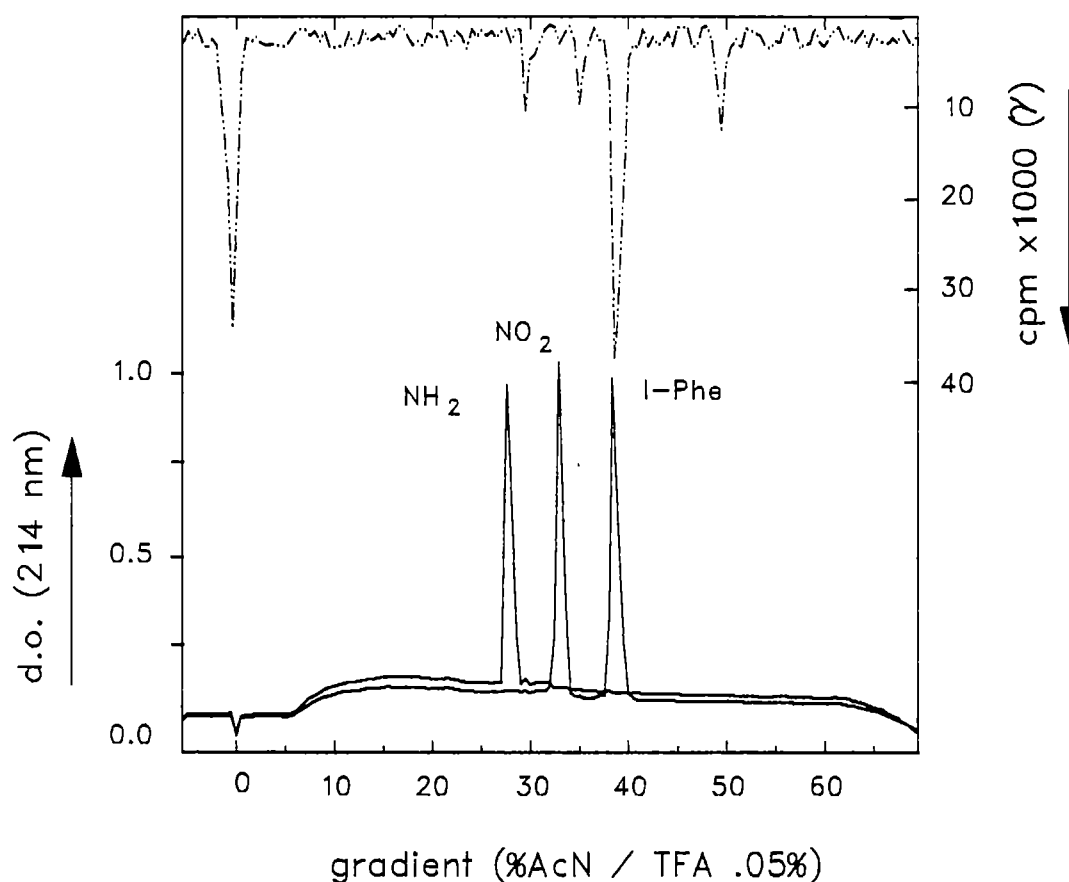


Figure 13. Iodation du [Sar¹, Val⁵, NO₂-D-Phe⁸]Ang (NO₂-Ang) par la réaction de Gattermann/Sandmeyer.

Co-élution en HPLC du mélange réactionnel d'une iodation du NO₂-Ang avec divers analogues de l'Ang substitués en position 8: [Sar¹, Val⁵, p-X-D-Phe⁸]Ang où X= NO₂, NH₂ ou I. La densité optique et le niveau de radioactivité sont représentés en ordonnée alors que le gradient d'acétonitrile est indiqué en abscisse. Une espèce radioactive co-élue avec le [Sar¹, Val⁵, I-D-Phe⁸]Ang (I-Ang), il s'agit vraisemblablement de ¹²⁵I-Ang.

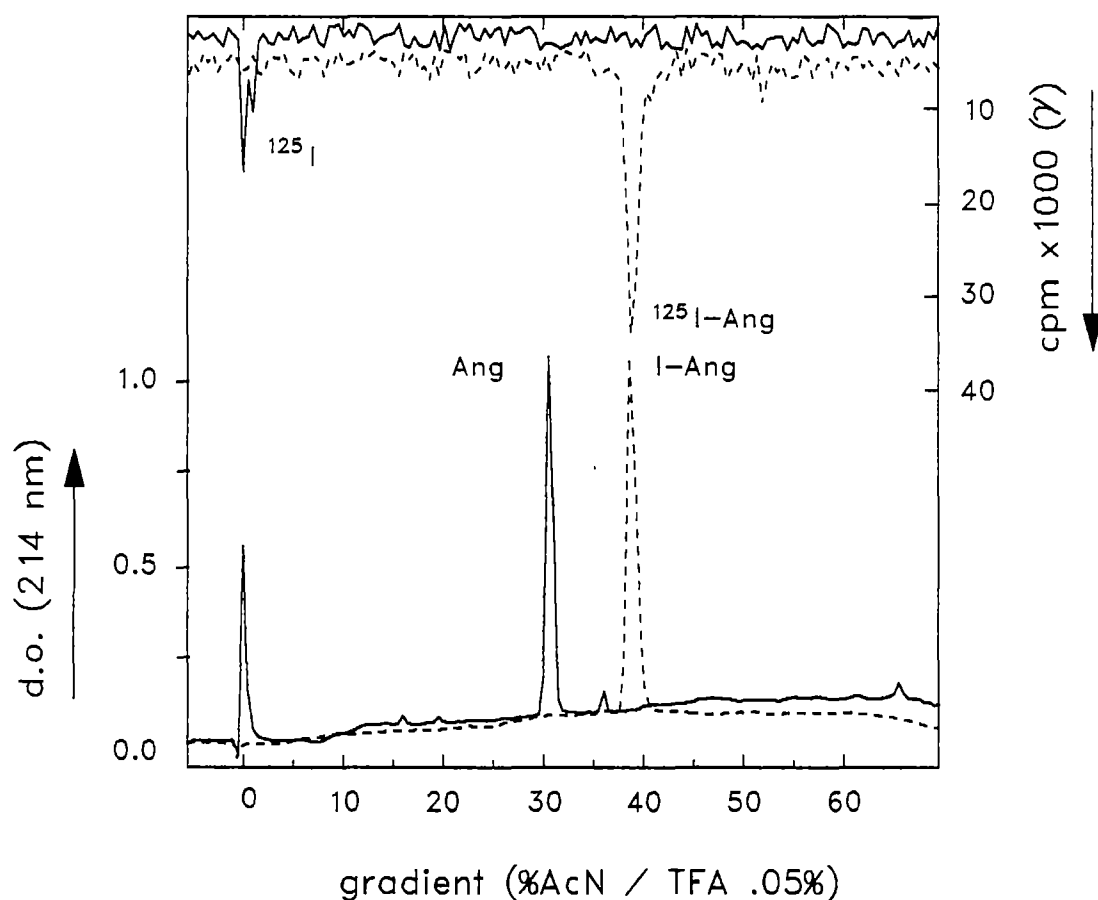


Figure 14. Réduction du [Sar¹,Val⁵,I-Phe⁸]Ang (I-Ang) par hydrogénation catalytique.

Chromatogramme constitué de deux éluations. En trait discontinu: 25 µl d'une solution de I-Ang 1 mM contenant 10⁶ CPM de ¹²⁵I-Ang et en trait continu: mélange identique au précédent mais soumis à une réduction. Le I-Ang, soumis à une hydrogénation, se transforme en Ang. Dans le système HPLC utilisé, l'Ang standard élue vers 31% (non-montré). Le composé obtenu suite à la réduction élue précisément à cet endroit. Sur l'échelle de radioactivité (γ), on peut observer la disparition du pic caractérisant le ¹²⁵I-Ang et l'apparition de ¹²⁵I libre sous forme de sels.

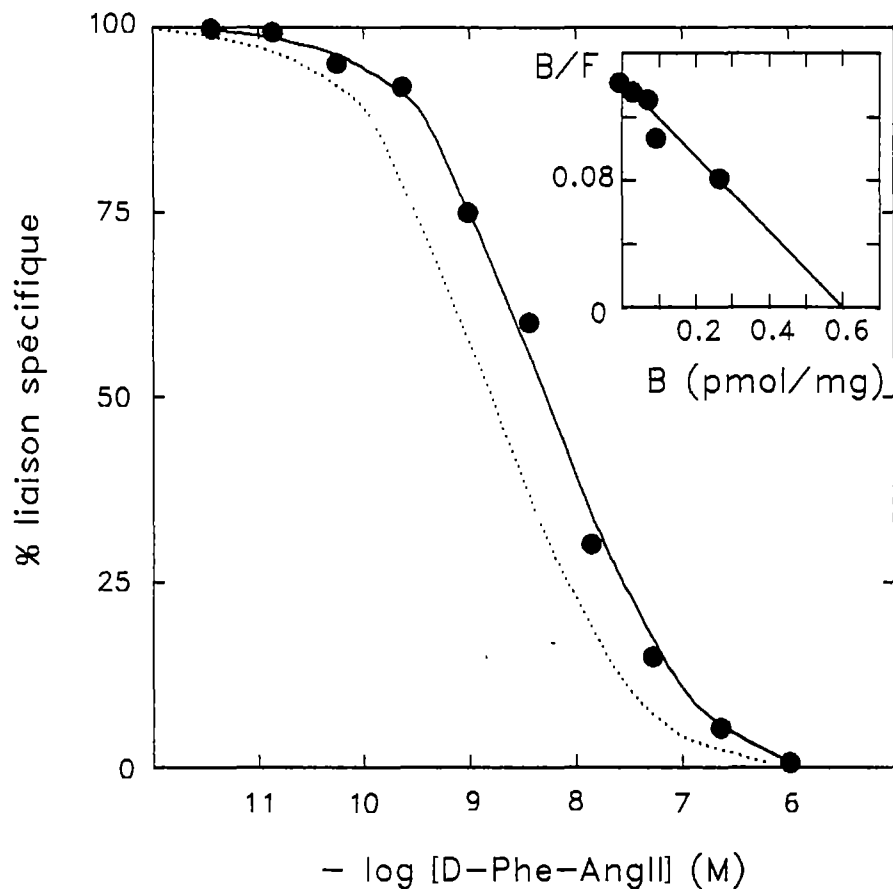


Figure 15. Essais de liaison (déplacement et saturation) du [Sar¹, Val⁵, ¹²⁵I-D-Phe⁸]Ang (¹²⁵I-Ang) sur membranes de cortex surrénalien bovin.

Courbe de déplacement du ¹²⁵I-Ang par le D-Phe-Ang. Le pourcentage de liaison spécifique du traceur est présenté en ordonnée alors qu'en abscisse se retrouve la concentration du D-Phe-Ang. Quand le [Sar¹, ¹²⁵I-Tyr⁴, Val⁵, D-Phe⁸]Ang est utilisé (trait pointillé) le IC₅₀ du D-Phe-Ang est d'environ 3 nM alors qu'il est de l'ordre de 15 nM (trait plein) quand on emploie le ¹²⁵I-Ang. La courbe de Scatchard présentée en encart indique que le radioligand ne semble toucher qu'une seule population de récepteurs. La liaison totale (B.max.) s'établit entre 0.60 pmol/mg protéine et la constante d'affinité (Kd) du radioligand fut évaluée à 1.07 nM. En utilisant 50 µg de protéine, la liaison totale du marqueur représente environ 25% dont 14-16 % est spécifique. Chaque courbe est représentative d'une série de 3 déterminations menées distinctement. Chaque point résulte de la moyenne d'au moins 2 lectures.

alors qu'il est de l'ordre de 15 nM quand on emploie le ^{125}I -Ang. La radioactivité spécifique moyenne du ^{125}I -Ang s'établit à 450 Ci/mmol.

(E) Iodation du [Dmpa¹,NO₂-Phe²,Val⁴,Lys⁸,D-Tyr⁹]VP (NO₂-VP) par la réaction de Gattermann/Sandmeyer et essais de liaison du radioligand obtenu.

Le marquage du NO₂-VP a produit du [Dmpa¹, ^{125}I -Phe², Val⁴, Lys⁸, D-Tyr⁹]VP (^{125}I -VP) avec un rendement de 65%. Un profil typique d'élution du mélange réactionnel (γ) et de certains analogues de la VP est présenté à la figure 16. L'espèce radioactive dominante co-élue avec le [Dmpa¹,I-Phe²,Val⁴,Lys⁸,D-Tyr⁹]VP (I-VP), il s'agit sans aucun doute de ^{125}I -VP. Un échantillon de la fraction contenant le ^{125}I -VP fut co-injecté en présence de I-VP dans deux systèmes de solvants (TFA et HCl-NaCl) et dans chaque cas, une co-élution a été obtenue (non-montré). Des essais de liaison ont été entrepris avec cette fraction et des résultats typiques sont présentés à la figure 17. Le ^{125}I -VP est déplaçable par l'AVP sur des membranes de foie de rat. En utilisant 100 μg de protéines, la liaison totale fut d'environ 60% dont 45-50% était spécifique. La liaison du ^{125}I -VP aux récepteurs de la vasopressine est saturable à en juger par la courbe de Scatchard présentée en médaillon. Le radioligand ne semble toucher qu'une seule population de récepteurs. La liaison totale (B.max.) s'établit à environ 0.9 pmol/mg protéine et la constante d'affinité (Kd) du radioligand fut évaluée à 1 nM (voir annexe 1b). Les expériences de déplacements montrent une variation de l'IC₅₀ du compétiteur non-radioactif (AVP) en fonction du traceur utilisé. Quand le [Dmpa¹,Phe²,Val⁴,Lys⁸, ^{125}I -D-Tyr⁹]VP est utilisé le IC₅₀ de l'AVP est de 0.5 nM alors qu'il est de l'ordre de 1 nM quand on emploie le ^{125}I -VP. La radioactivité spécifique moyenne du ^{125}I -VP s'établit à 1500 Ci/mmol.

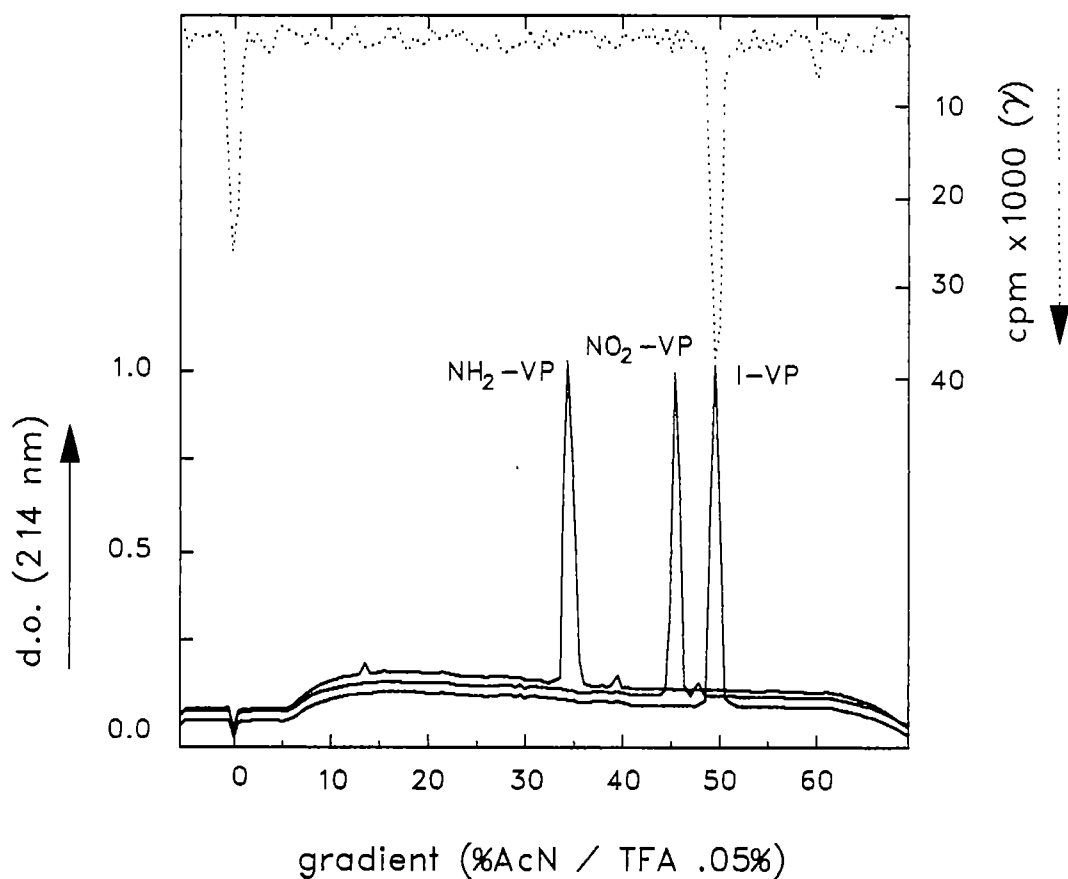


Figure 16. Iodation du [Dmpa¹,NO₂-Phe²,Val⁴,Lys⁸,D-Tyr⁹]VP (NO₂-VP) par la réaction de Gattermann/Sandmeyer.

Co-élution en HPLC du mélange réactionnel d'une iodation du NO₂-VP avec divers analogues de la VP substitués en position 2: [Dmpa¹,p-X-Phe²,Val⁴,Lys⁸,D-Tyr⁹]VP où X= NO₂, NH₂ ou I. La densité optique et le niveau de radioactivité sont représentés en ordonnée alors que le gradient d'acétonitrile est indiqué en abscisse. Une espèce radioactive co-élue avec le [Dmpa¹,I-Phe²,Val⁴,Lys⁸,D-Tyr⁹]VP (I-VP), il s'agit de ¹²⁵I-VP.

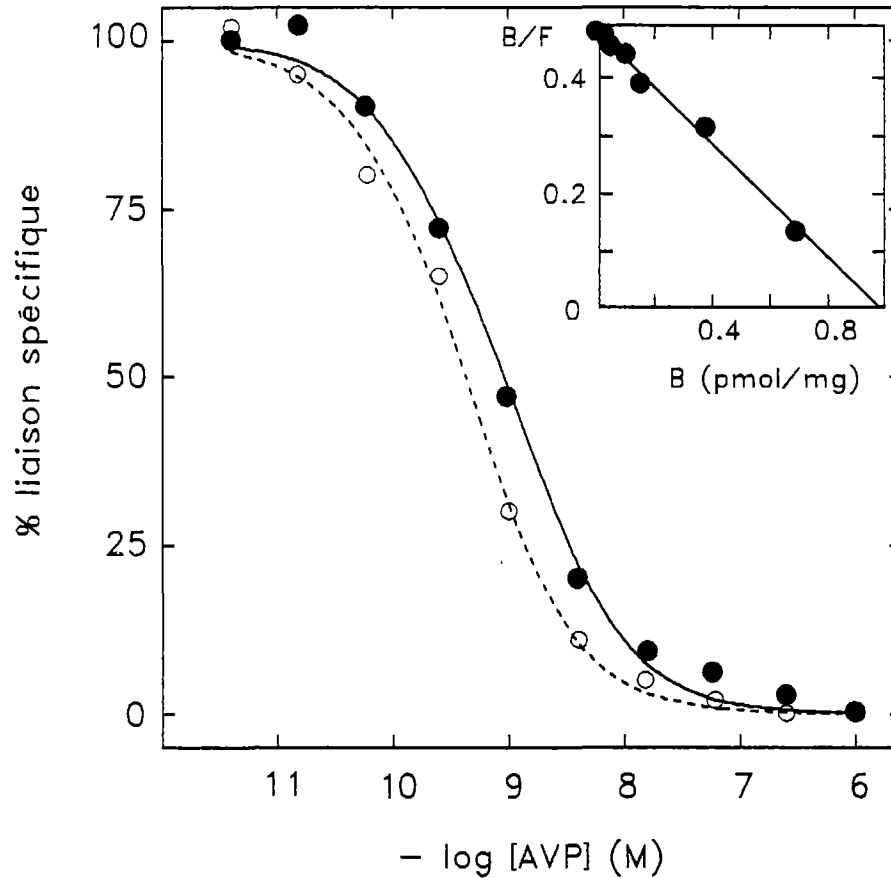


Figure 17. Essais de liaison (déplacement et saturation) du [Dmpa¹, ¹²⁵I-Phe², Val⁴, Lys⁸, D-Tyr⁹]VP (¹²⁵I-VP) sur membranes de foie de rat.

Courbe de déplacement du $^{125}\text{I-VP}$ par l'AVP. Le pourcentage de liaison spécifique du traceur est présenté en ordonnée alors qu'en abscisse se retrouve la concentration de l'AVP. Quand le [Dmpa¹, Phe², Val⁴, Lys⁸, ¹²⁵I-D-Tyr⁹]VP est utilisé (trait pointillé) le IC_{50} du D-Phe-Ang est d'environ 0.5 nM alors qu'il est de l'ordre de 1 nM (trait plein) quand on emploie le $^{125}\text{I-VP}$. Une courbe de Scatchard est présentée en encart. A la vue de ce tracé, le radioligand ne semble toucher qu'une seule population de récepteurs. La liaison totale (B.max.) s'établit entre 0.9 pmol/mg protéine et la constante d'affinité (Kd) du radioligand fut évaluée à 1 nM. En utilisant 100 μg de protéine, la liaison totale du marqueur est d'environ 60% dont près de 50% est spécifique. Chaque courbe est représentative d'une série de 3 déterminations menées distinctement. Chaque point résulte de la moyenne d'au moins 2 lectures.

(F) Iodation du [NO₂-Phe⁴,Leu⁵]Enképhaline (NO₂-Enk) par la réaction de Gattermann/Sandmeyer et essais de liaison du radioligand obtenu.

Le marquage du NO₂-Enk a produit du [¹²⁵I-Phe⁴,Leu⁵]Enképhaline (¹²⁵I-Enk) avec un rendement moyen de 60%. Un profil typique d'élution du mélange réactionnel (γ) et de certains analogues du [Leu⁵]Enk est présenté à la figure 18. L'espèce radioactive dominante co-élue avec le [I-Phe⁴, Leu⁵]Enképhaline (I-Enk), il s'agit de ¹²⁵I-Enk. Un échantillon de la fraction contenant le ¹²⁵I-Enk fut co-injecté en présence de I-Enk dans deux systèmes de solvants (TFA et HCl-NaCl) et dans chaque cas, une co-élution a été obtenue (non-montré). L'analyse des produits de réduction d'un mélange de I-Enk et de ¹²⁵I-Enk nous permet d'observer la production de [Leu⁵]Enk (à partir du I-Enk) et de ¹²⁵I libre (non-montré). Ces observations constituent une solide preuve d'obtention du produit correctement iodé. Le log du coefficient de partition du ¹²⁵I-Enk se chiffre à 1.45. Des essais de liaison ont été entrepris avec cette fraction et un résultat représentatif est présenté à la figure 19. Le ¹²⁵I-Enk est déplaçable par le I-Enk sur des membranes de cerveaux de rats. En utilisant 1 mg de protéines, la liaison totale fut d'environ 20% dont 10% était spécifique. La liaison du ¹²⁵I-Enk aux récepteurs opiacés est saturable à en juger par la courbe de Scatchard présentée en encart. La courbe de Scatchard est dérivée de l'expérience de saturation. Le radioligand semble toucher plus qu'une population de récepteurs à en juger par l'aspect curviligne du tracé. Ce phénomène se traduit aussi par un déplacement s'effectuant sur près de 4 unités logarithmiques. La liaison totale (B.max.) s'établit à environ 110 fmol/mg protéine. Les constantes d'affinités (Kd) du radioligand sont de 0.7 nM (B.max.≈25 fmol/mg prot.) pour le site à haute affinité et de 5.3 nM (B.max.≈95 fmol/mg prot.) pour le site de basse affinité (annexe 1c).

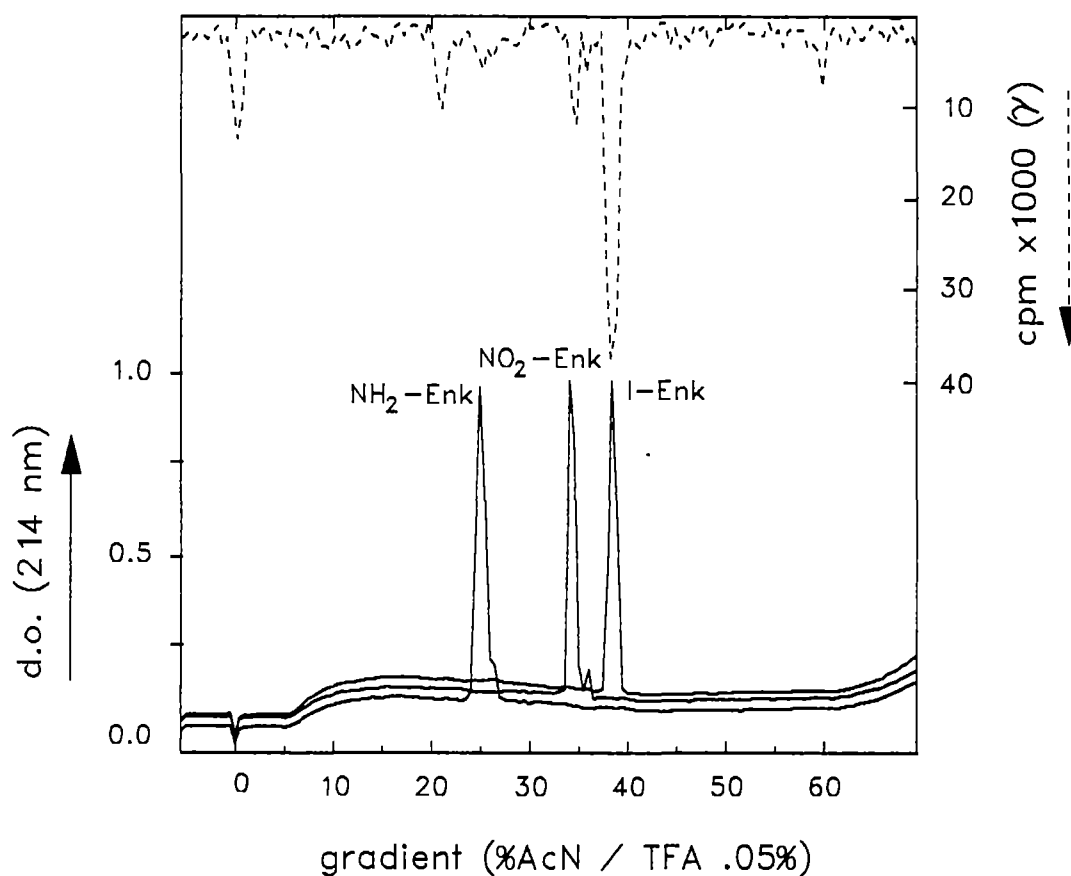


Figure 18. Iodation du $[\text{NO}_2\text{-Phe}^4, \text{Leu}^5]\text{Enképhaline}$ ($\text{NO}_2\text{-Enk}$) par la réaction de Gattermann/Sandmeyer.

Co-élution en HPLC du mélange réactionnel d'une iodation du $\text{NO}_2\text{-Enk}$ avec divers analogues du $[\text{Leu}^5]\text{Enképhaline}$ substitués en position 4: $[\text{p-X-Phe}^4, \text{Leu}^5]\text{Enk}$ où $\text{X} = \text{NO}_2, \text{NH}_2$ ou I . La densité optique et le niveau de radioactivité sont représentés en ordonnée alors que le gradient d'acétonitrile est indiqué en abscisse. Une espèce radioactive co-élue avec le $[\text{I-Phe}^4, \text{Leu}^5]\text{Enképhaline}$ (I-Enk), il s'agit de $^{125}\text{I-Enk}$.

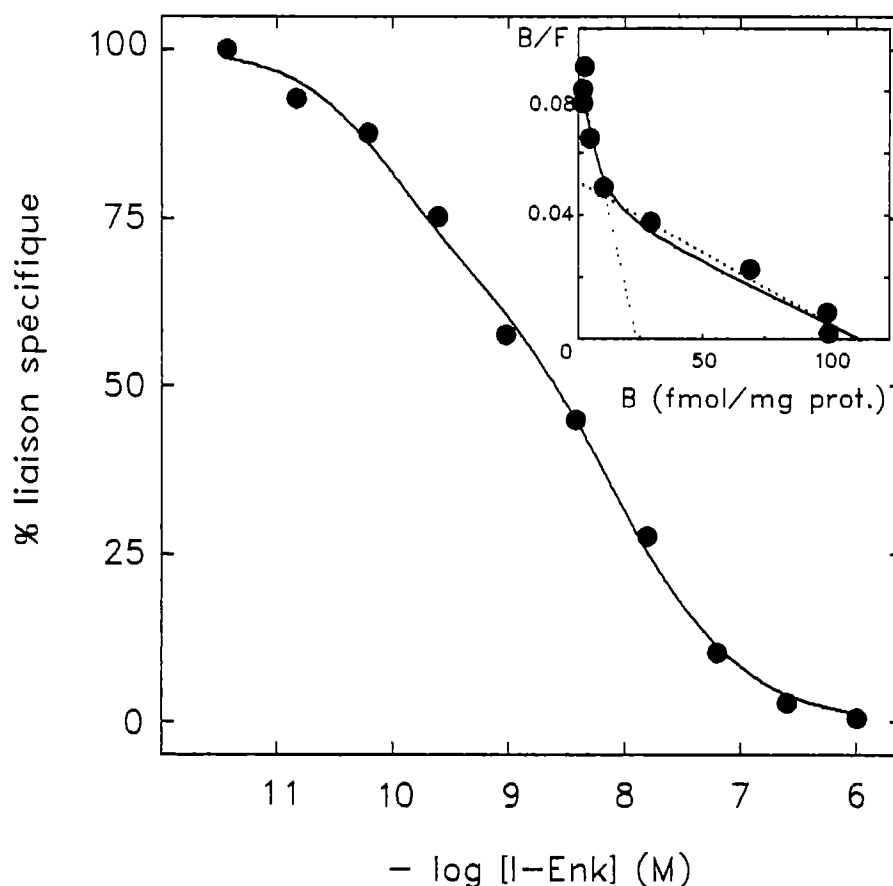


Figure 19. Essais de liaison (déplacement et saturation) du [^{125}I -Phe 4 , Leu 5]Enképhaline (^{125}I -Enk) sur membranes de cerveaux de rats.

Courbe de déplacement du ^{125}I -Enk par le [I-Phe 4 ,Leu 5]Enképhaline (I-Enk). Le pourcentage de liaison spécifique du traceur est présenté en ordonnée alors qu'en abscisse se retrouve la concentration du I-Enk. Le ^{125}I -Enk est déplaçable par le I-Enk sur des membranes de cerveaux de rats. En utilisant 1 mg de protéines, la liaison totale fut d'environ 20% dont 10% était spécifique. La liaison du ^{125}I -Enk aux récepteurs opiacés est saturable à en juger par la courbe de Scatchard présentée en encart. Le radioligand semble toucher plus qu'une population de récepteurs à en juger par l'aspect curviligne du tracé. Ce phénomène se traduit aussi par un déplacement s'effectuant sur près de 4 unités logarithmiques. La liaison totale (B.max.) s'établit à environ 110 fmol/mg protéine. Les constantes d'affinités (K_d) du radioligand sont de 0.7 nM (B.max. \approx 25 fmol/mg prot.) pour le site à haute affinité et de 5 nM (B.max. \approx 85 fmol/mg prot.) pour le site de basse affinité. Chaque courbe est représentative d'une série de 3 déterminations menées distinctement. Chaque point résulte de la moyenne d'au moins 2 lectures.

(G) Iodation du [D-Pen^{2,5},NO₂-Phe⁴]Enképhaline (NO₂-DPDP) par la réaction de Gattermann/Sandmeyer et essais de liaison du radioligand obtenu.

Le marquage du NO₂-DPDP a produit du [D-Pen^{2,5},¹²⁵I-Phe⁴]Enképhaline (¹²⁵I-DPDP) avec un rendement moyen de 55%. Un profil typique d'élution du mélange réactionnel (γ) et de certains analogues du [D-Pen^{2,5}]Enképhaline (DPDP) est présenté à la figure 20. L'espèce radioactive dominante co-élue avec le [D-Pen^{2,5},I-Phe⁴]Enképhaline (I-DPDP), il s'agit de ¹²⁵I-DPDP. Un échantillon de la fraction contenant le ¹²⁵I-DPDP fut co-injecté en présence de I-DPDP dans deux systèmes de solvants (TFA et HCl-NaCl) et dans chaque cas, une co-élution a été obtenue (non-montré). L'analyse des produits de réduction d'un mélange de I-DPDP et de ¹²⁵I-DPDP nous permet d'observer la production de DPDP (à partir du I-DPDP) et de ¹²⁵I libre (non-montré). Ces observations constituent une solide preuve de l'obtention du produit correctement iodé. Le log du coefficient de partition du ¹²⁵I-DPDP se chiffre à 1.56. Des essais de liaison ont été entrepris avec cette fraction et un résultat représentatif est présenté à la figure 21. Le ¹²⁵I-DPDP est déplaçable par le I-DPDP sur des membranes de cerveaux de rats. En utilisant 500 μ g de protéines, la liaison totale fut d'environ 11% dont 8% était spécifique. La liaison du ¹²⁵I-DPDP aux récepteurs opiacés est saturable à en juger par la courbe de Scatchard présentée en médaillon. La courbe de Scatchard est dérivée de l'expérience de déplacement. Le radioligand ne semble toucher qu'une population de récepteurs à en juger par l'aspect rectiligne du tracé. Ce phénomène se traduit aussi par un déplacement s'effectuant sur moins de 3 unités logarithmiques. La liaison totale (B.max.) s'établit à environ 95 fmol/mg protéine. On évalue la constante d'affinité (Kd) du radioligand à 1.6 nM (voir annexe 1d). La radioactivité spécifique moyenne

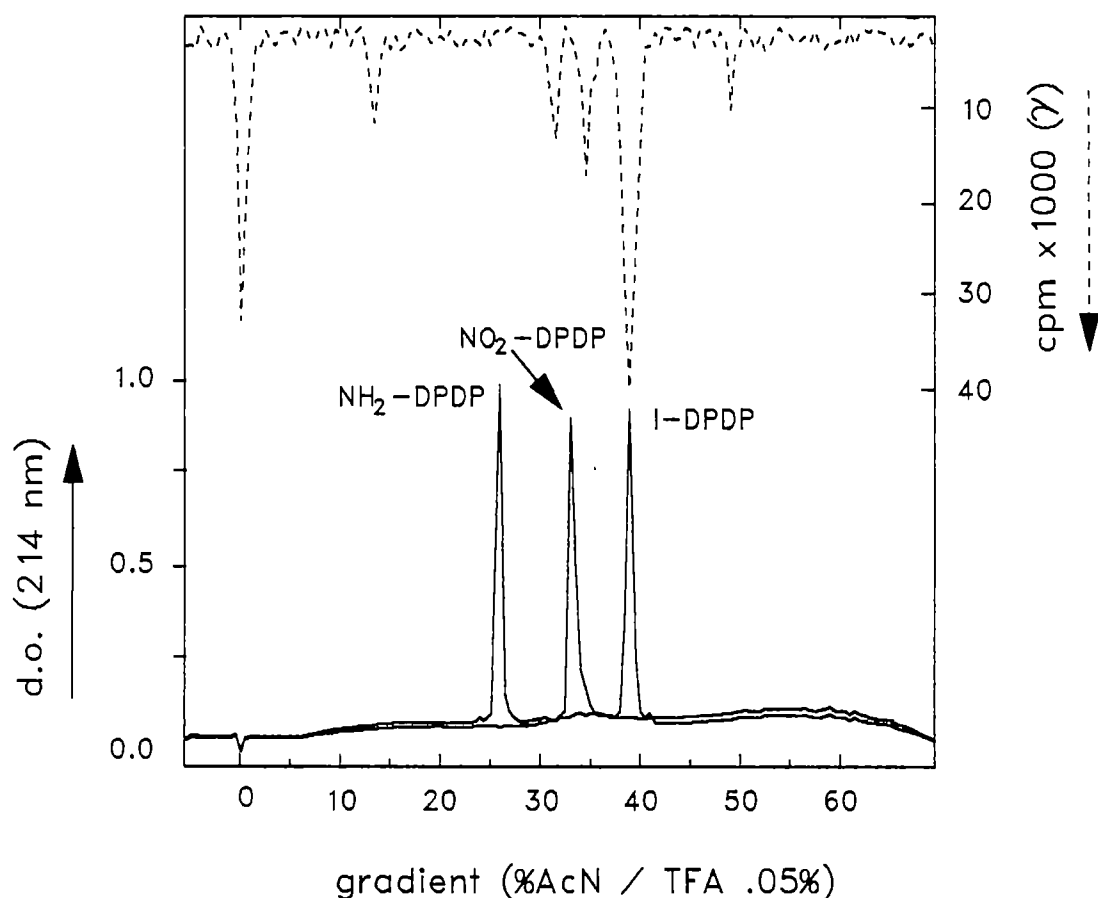


Figure 20. Iodation du [D-Pen^{2,5},NO₂-Phe⁴]Enképhaline (NO₂-DPDP) par la réaction de Gattermann/Sandmeyer.

Co-élution en HPLC du mélange réactionnel d'une iodation du NO₂-DPDP avec divers analogues du [D-Pen^{2,5}]Enképhaline substitués en position 4: [D-Pen^{2,5}, p-X-Phe⁴,Leu⁵]Enképhaline où X= NO₂, NH₂ ou I. La densité optique et le niveau de radioactivité sont représentés en ordonnée alors que le gradient d'acétonitrile est indiqué en abscisse. Une espèce radioactive co-élue avec le [D-Pen^{2,5}, I-Phe⁴]Enképhaline (I-DPDP), il s'agit de ¹²⁵I-DPDP.

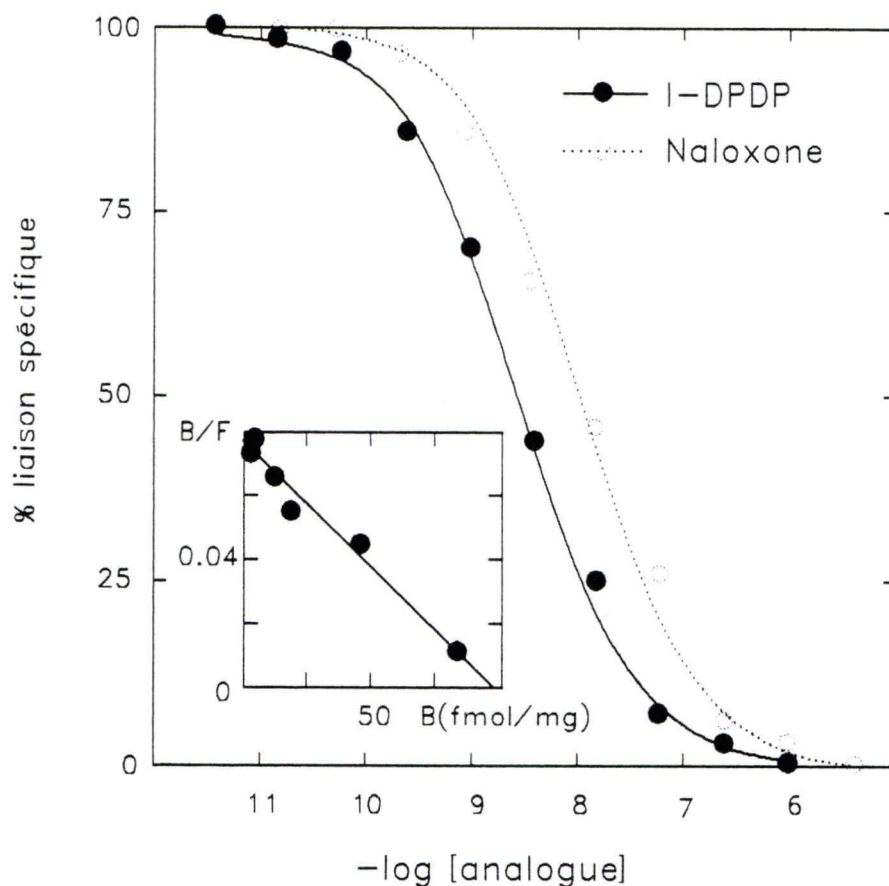


Figure 21. Essais de liaison (déplacement) du [D-Pen^{2,5}, ¹²⁵I-Phe⁴]Enképhaline (¹²⁵I-DPDP) sur membranes de cerveaux de rats.

Courbe de déplacement du ¹²⁵I-DPDP par le [D-Pen^{2,5}, I-Phe⁴]Enképhaline (I-DPDP) et le Naloxone. Le pourcentage de liaison spécifique du traceur est présenté en ordonnée alors qu'en abscisse se retrouve la concentration du I-DPDP. Le ¹²⁵I-DPDP est déplaçable par le I-DPDP et le naloxone sur des membranes de cerveaux de rats. En utilisant 500 µg de protéines, la liaison totale fut d'environ 11% dont 8% était spécifique. La liaison du ¹²⁵I-DPDP aux récepteurs opiacés est saturable à en juger par la courbe de Scatchard présentée en encart. Le radioligand ne semble toucher qu'une population de récepteurs à en juger par l'aspect rectiligne du tracé. La liaison totale (B.max.) s'établit à environ 95 fmol/mg protéine. La constante d'affinité (Kd) du radioligand est de 1.6 nM. Chaque courbe est représentative d'une série de 3 déterminations menées distinctement. Chaque point résulte de la moyenne d'au moins 2 lectures.

du ^{125}I -DPDP s'établit à 1500 Ci/mmol.

(H) Iodation du Tyr-D-Arg-(NO₂)Phe-Lys (NO₂-DALDA) par la réaction de Gattermann/Sandmeyer et essais de liaison du radioligand obtenu.

Le NO₂-DALDA a été iodé avec un rendement moyen de 50%. Le chromatogramme présenté à la figure 22 nous montre une co-élution entre une espèce radioiodée issue du mélange réactionnel et le Tyr-D-Arg-(I)Phe-Lys (I-DALDA). Il s'agit de Tyr-D-Arg-(^{125}I)Phe-Lys (^{125}I -DALDA). Une co-élution entre les espèces radioactive et non-radioactive du I-DALDA a aussi été obtenue dans un autre système de solvant (HCl/NaCl, non-montré). L'analyse des produits de réduction d'un mélange de I-DALDA et de ^{125}I -DALDA nous permet d'observer la production de DALDA (à partir du I-DALDA) et de ^{125}I libre (non-montré). Ces observations constituent une solide preuve de l'obtention du produit correctement iodé. Le log du coefficient de partition du ^{125}I -DALDA se chiffre à -1.27. Ce radioligand est déplaçable par le I-DALDA et le naloxone sur des membranes de cerveaux de rats (fig.23). Le I-DPDP n'a pas déplacé le radioligand même à une concentration de 100 nM. Une courbe de Scatchard dérivée de la courbe de déplacement du ^{125}I -DALDA par le I-DALDA est présentée en encart. Le I-DALDA ne semble toucher qu'une population de récepteurs puisque le tracé est plutôt rectiligne. La constante d'affinité du radioligand (Kd) calculée à partir de ce tracé se chiffre à 7.1 nM (annexe 1e) et le nombre maximum de sites (Bmax) à 115 fmol/mg de protéine. En utilisant 50000 CPM du radioligand et 400 g de protéines, la liaison totale du ligand se chiffre entre 5-10% dont seulement 2-3% est spécifique (fig.24). Sur ce graphique on voit des exemples représentatifs de déplacement du I-DALDA

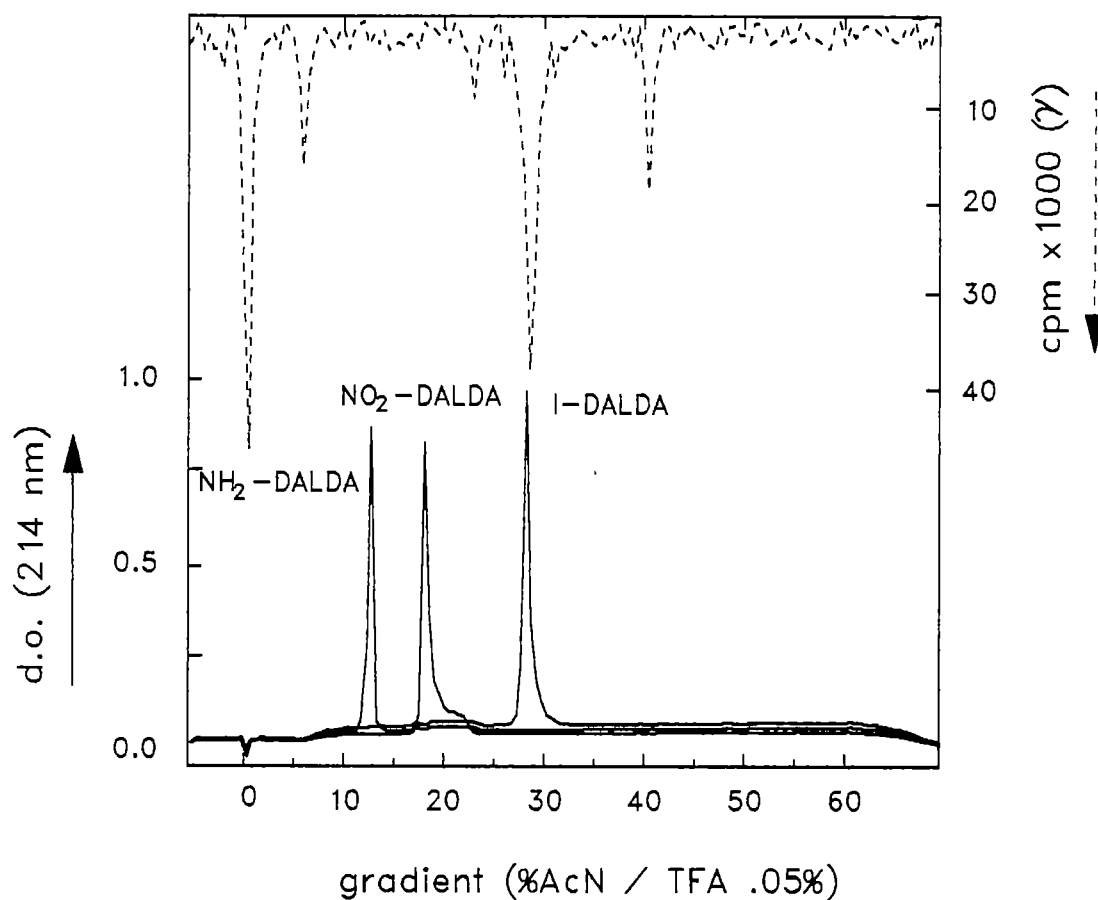


Figure 22. Iodation du Tyr-D-Arg-(NO₂)Phe-Lys (NO₂-DALDA) par la réaction de Gattermann/Sandmeyer.

Co-élution en HPLC du mélange réactionnel d'une iodation du NO₂-DALDA avec divers analogues du DALDA substitués en position 3: Tyr-D-Arg-(X)Phe-Lys où X= NO₂, NH₂ ou I. La densité optique et le niveau de radioactivité sont représentés en ordonnée alors que le gradient d'acétonitrile est indiqué en abscisse. Une espèce radioactive co-élue avec le Tyr-D-Arg-(I)Phe-Lys (I-DALDA), il s'agit de ¹²⁵I-DALDA.

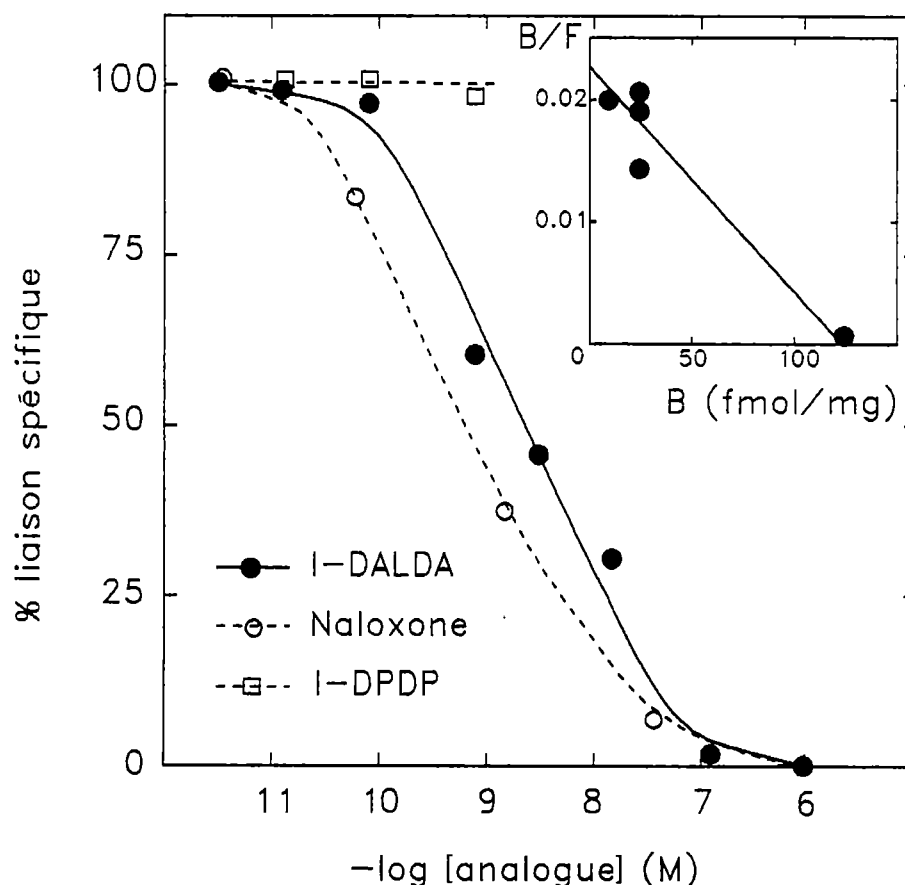


Figure 23. Essais de liaison (déplacement) du Tyr-D-Arg-(¹²⁵I)Phe-Lys (¹²⁵I-DALDA) sur membranes de cerveaux de rats.

Courbes de déplacement du ¹²⁵I-DALDA par le Tyr-D-Arg-(I)Phe-Lys (I-DALDA), le naloxone et le I-DPDP. Le pourcentage de liaison spécifique du traceur est présenté en ordonnée alors qu'en abscisse se retrouve la concentration des analogues servant au déplacement. Le ¹²⁵I-DALDA est déplaçable par le I-DALDA et le naloxone mais ne l'est pas par le I-DPDP (100 nM). En utilisant 400 µg de protéines, la liaison totale fut d'environ 8% dont près de 2.5% était spécifique. La liaison du ¹²⁵I-DALDA aux récepteurs opiacés est saturable à en juger par la courbe de Scatchard présentée en encart. Le radioligand ne semble toucher qu'une population de récepteurs étant donné l'aspect rectiligne du tracé. La liaison totale (B.max.) s'établit à environ 125 fmol/mg protéine. La constante d'affinité (Kd) du radioligand est de 7.1 nM. Chaque courbe est représentative d'une série de 3 déterminations menées distinctement. Chaque point résulte de la moyenne d'au moins 2 lectures.

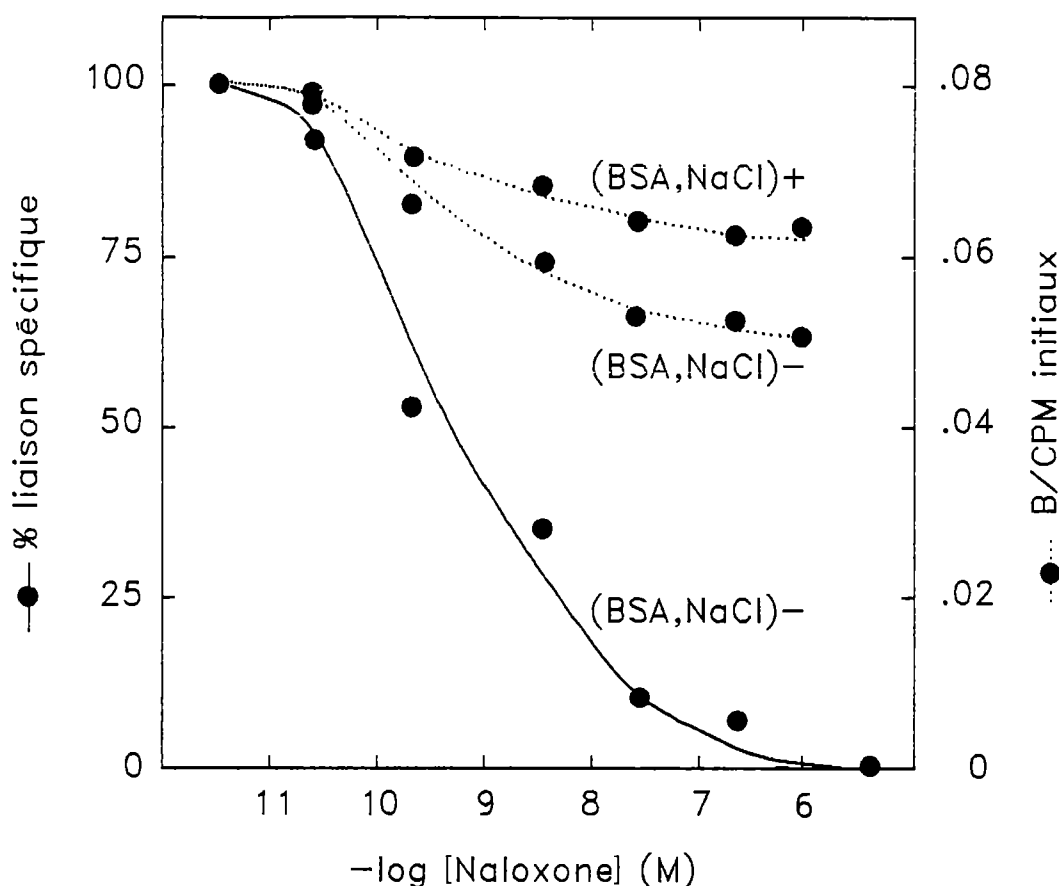


Figure 24. Effet du BSA et du NaCl sur le déplacement du Tyr-D-Arg-(125 I)Phe-Lys (125 I-DALDA) par le naloxone sur membranes de cerveaux de rats.

Courbe de déplacement du 125 I-DALDA par le naloxone en absence ou en présence de BSA et de NaCl. Le pourcentage de liaison spécifique du traceur est présenté en ordonnée de gauche alors qu'en ordonnée de droite se trouve le ratio du 125 I-DALDA lié (B) sur la quantité initiale (CPM initial) utilisée. En abscisse se retrouve la concentration du naloxone servant au déplacement. Cet exemple représentatif démontre que les manipulations faites en présence de BSA et de NaCl (traits pointillés) suscite dans l'ensemble un niveau de liaison non-spécifique 10% plus élevée que celles faites en absence de ces composés ($0.062/0.08=77\%$ vs $0.053/0.08=66\%$). La courbe en traits pleins représente la liaison spécifique du 125 I-DALDA en absence de NaCl et de BSA. Les manipulations se sont déroulées à l'aide de 50000 CPM de 125 I-DALDA et de 500 μ g (prot.) de membranes dans un volume de 400 μ l. Chaque courbe est représentative d'une série de 3 déterminations menées distinctement. Chaque point résulte de la moyenne d'au moins 2 lectures.

par du naloxone sur des membranes de cerveaux de rats, en présence ou en absence de BSA et NaCl. Les manipulations faites en présence de BSA et de NaCl suscitent dans l'ensemble un niveau de liaison non-spécifique 10% plus élevée que celles faites en absence de ces composés ($0.062/0.08=77\%$ vs $0.053/0.080=66\%$). La radioactivité spécifique moyenne du ^{125}I -DALDA s'établit à 600 Ci/mmol.

(I) Iodation du Tyr-D-Ala-Phe-NO₂Phe (NO₂-YaFF) par la réaction de Gattermann/Sandmeyer et essais de liaison du radioligand obtenu.

Le NO₂-YaFF a été iodé avec un rendement moyen de 60%. Le chromatogramme présenté à la figure 25 nous montre une co-élution entre une espèce radioiodée issue du mélange réactionnel et le Tyr-D-Ala-Phe-(I)Phe (I-YaFF). Il s'agit de Tyr-D-Ala-Phe-(^{125}I)Phe (^{125}I -YaFF). Une co-élution entre les espèces radioactive et non-radioactive du I-YaFF a aussi été obtenue dans un autre système de solvant (HCl/NaCl, non-montré). L'analyse des produits de réduction d'un mélange de I-YaFF et de ^{125}I -YaFF nous permet d'observer la production de YaFF (à partir du I-YaFF) et de ^{125}I libre (non-montré). Ces observations constituent une solide preuve de l'obtention d'un produit correctement iodé. Le log du coefficient de partition du ^{125}I -YaFF se chiffre à 1.50. Ce radioligand est déplaçable par le I-YaFF et le naloxone sur des membranes de cerveaux de rats (fig.26). Le I-DPDP n'a pas déplacé le ^{125}I -YaFF et ce jusqu'à une concentration de 100 nM (non-montré). Une courbe de Scatchard dérivée de la courbe de déplacement du ^{125}I -YaFF par le I-YaFF est présentée en médaillon. Le I-YaFF ne semble toucher qu'une population de récepteurs puisque le tracé est plutôt rectiligne. La constante d'affinité du radioligand (Kd) calculée à partir de ce tracé se chiffre à 10.1 nM (annexe 1f) et le nombre

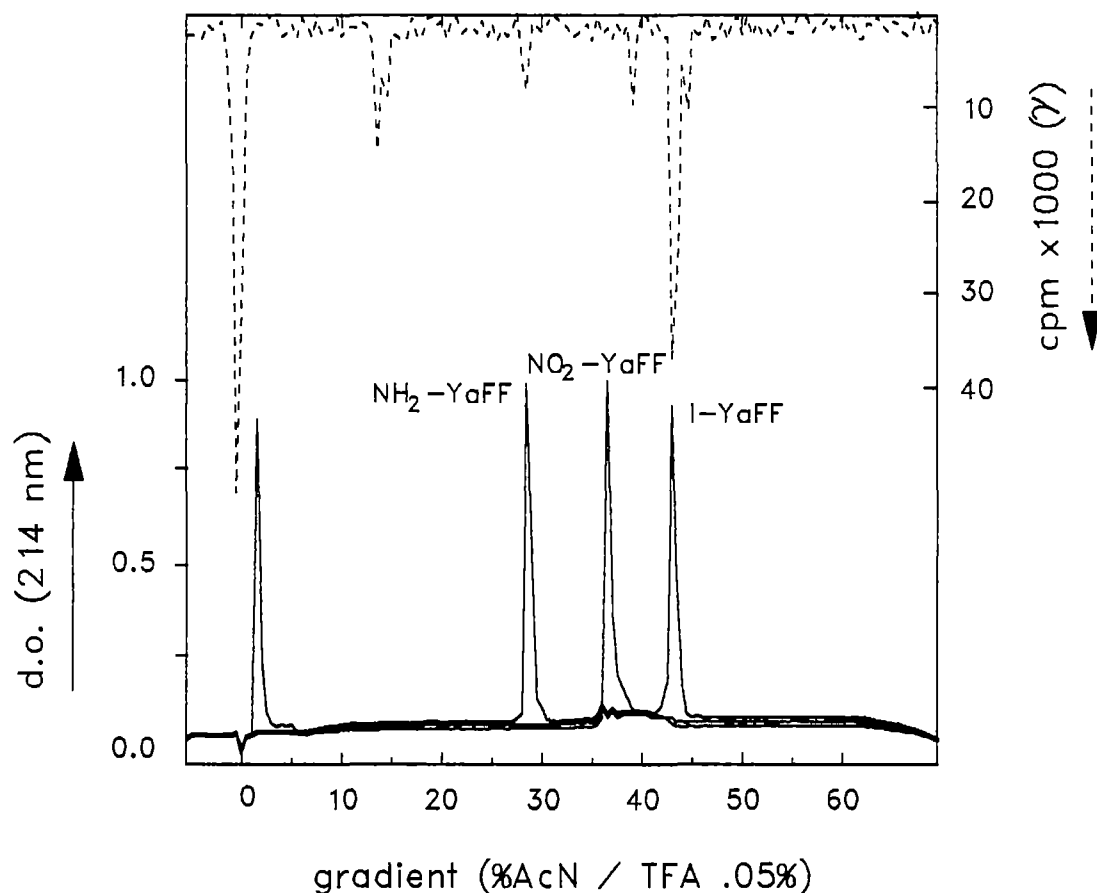


Figure 25. Iodation du Tyr-D-Ala-Phe-(NO₂)Phe (NO₂-YaFF) par la réaction de Gatterman/Sandmeyer.

Co-élution en HPLC du mélange réactionnel d'une iodation du NO₂-YaFF avec divers analogues du YaFF substitués en position 4: Tyr-D-Ala-Phe-(X)Phe où X= NO₂, NH₂ ou I. La densité optique et le niveau de radioactivité sont représentés en ordonnée alors que le gradient d'acétonitrile est indiqué en abscisse. Une espèce radioactive co-élue avec le Tyr-D-Ala-Phe-(I)Phe (I-YaFF), il s'agit de ^{125}I -YaFF.

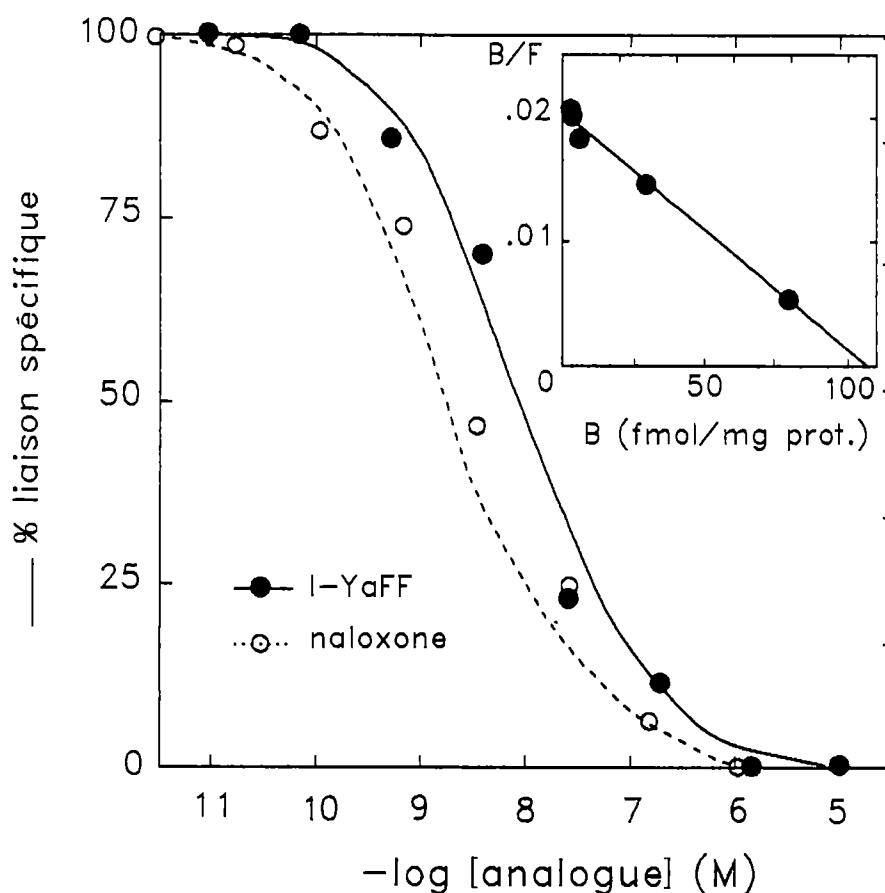


Figure 26. Essais de liaison (déplacement) du Tyr-D-Ala-Phe-(125 I)Phe (125 I-YaFF) sur membranes de cerveaux de rats.

Courbes de déplacement du 125 I-YaFF par le Tyr-D-Ala-Phe-(I)Phe (I-YaFF), courbe pleine) et le naloxone (courbe pointillée). Le pourcentage de liaison spécifique du traceur est présenté en ordonnée alors qu'en abscisse se retrouve la concentration des analogues servant au déplacement. Le 125 I-YaFF est déplaçable par le I-YaFF et le naloxone sur des membranes de cerveaux de rats. En utilisant 750 μ g de protéines, la liaison totale fut d'environ 6% dont près de 2% était spécifique. La liaison du 125 I-YaFF aux récepteurs opiacés est saturable à en juger par la courbe de Scatchard présentée en encart. Le radioligand ne semble toucher qu'une population de récepteurs à en juger par l'aspect rectiligne du tracé. La liaison totale (B.max.) s'établit à environ 105 fmol/mg protéine. La constante d'affinité (Kd) du radioligand est de 10.1 nM. Chaque courbe est représentative d'une série de 3 déterminations menées distinctement. Chaque point résulte de la moyenne d'au moins 2 lectures.

maximum de sites (B_{max}) à 105 fmol/mg de protéine. En utilisant 50000 CPM du radioligand et 400 μ g de protéines, la liaison totale du ligand se chiffre entre 5-10% dont seulement 2-3% est spécifique (fig.27). Sur ce graphique on voit des exemples représentatifs de déplacement du I-YaFF par du naloxone sur des membranes de cerveaux de rats. La présence ou l'absence de BSA et de NaCl n'a pas eu d'effet significatif sur la liaison non-spécifique du radioligand. La radioactivité spécifique moyenne du 125 I-DALDA s'établit à 500 Ci/mmol.

(J) Iodation du N-méthyl-N-[(1R,S)-1-(3-aminophényl)-2-(1-pyrrolidinyl)éthyl]acétamide (M201163 ou NH_2 -ICI) par la réaction de Gattermann/Sandmeyer et essais de liaison du radioligand obtenu.

Du 125 I-ICI a été produit avec un rendement moyen de 65%. La figure 28 présente un chromatogramme constitué des profils d'élution en HPLC du mélange réactionnel (75000 CPM), du NH_2 -ICI et un de ses analogues où le résidu aminophényl est remplacé par une fonction chlorophényl (Cl-ICI). L'espèce radioiodée éluant à proximité du Cl-ICI est vraisemblablement du 125 I-ICI. Des aliquots du composé marqué et du Cl-ICI ont aussi élué de façon analogue dans un autre système de solvant (HCl-NaCl, non-montré). L'analyse des produits de réduction d'un mélange de I-ICI et de 125 I-ICI nous permet d'observer la production d'un dérivé dont l'hydrophobicité se situe entre celle du NH_2 -ICI et celle du I-ICI. On observe aussi l'apparition de 125 I libre (non-montré). Ces observations constituent une solide preuve de l'obtention du produit correctement iodé. Le coefficient de partition du 125 I-ICI se chiffre à 1.28. Le 125 I-ICI est déplaçable par le naloxone et le Cl-ICI sur des membranes de cerveaux de cobayes (fig. 29). Le naloxone suscite un déplacement monophasique avec un IC_{50} de 10 nM. Le déplacement par le Cl-ICI,

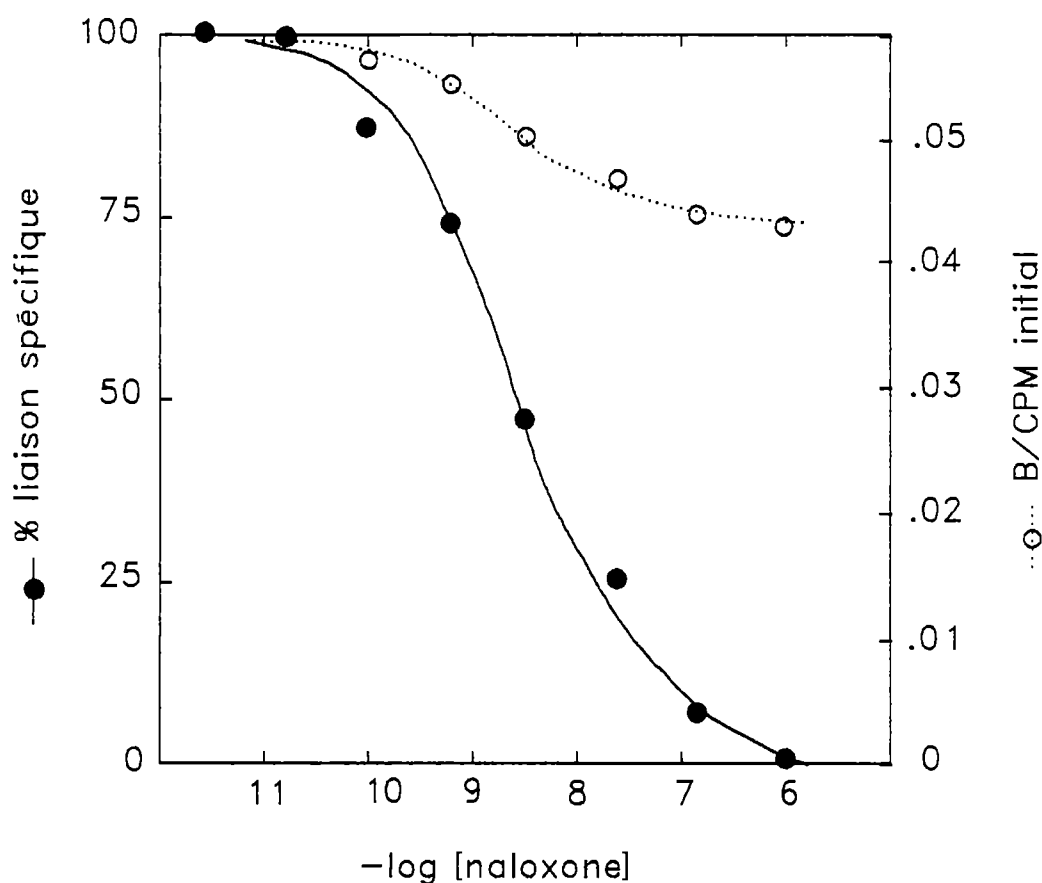


Figure 27. Séparation de liaison totale du Tyr-D-Ala-Phe-(^{125}I)Phe (^{125}I -YaFF) en ses composantes spécifique et non-spécifique.

Courbe de déplacement du ^{125}I -YaFF par le naloxone sur des membranes de cerveaux de rats. Le pourcentage de liaison spécifique du traceur est présenté en ordonnée de gauche alors qu'en ordonnée de droite se trouve le ratio du ^{125}I -YaFF lié (B) sur la quantité initiale de ce traceur utilisée (CPM initial). En abscisse se retrouve la concentration du naloxone servant au déplacement. La liaison totale du radioligand s'établit à près de 6% dont le tiers (2%) était spécifique. La présence ou l'absence de NaCl et BSA n'a pas fait varier significativement la liaison non-spécifique. Les manipulations se sont déroulées à l'aide de 50000 CPM de ^{125}I -DALDA et de 750 μg prot. de membranes dans un volume de 400 μl . La courbe est représentative d'une série de 3 déterminations menées distinctement. Chaque point résulte de la moyenne d'au moins 2 lectures.

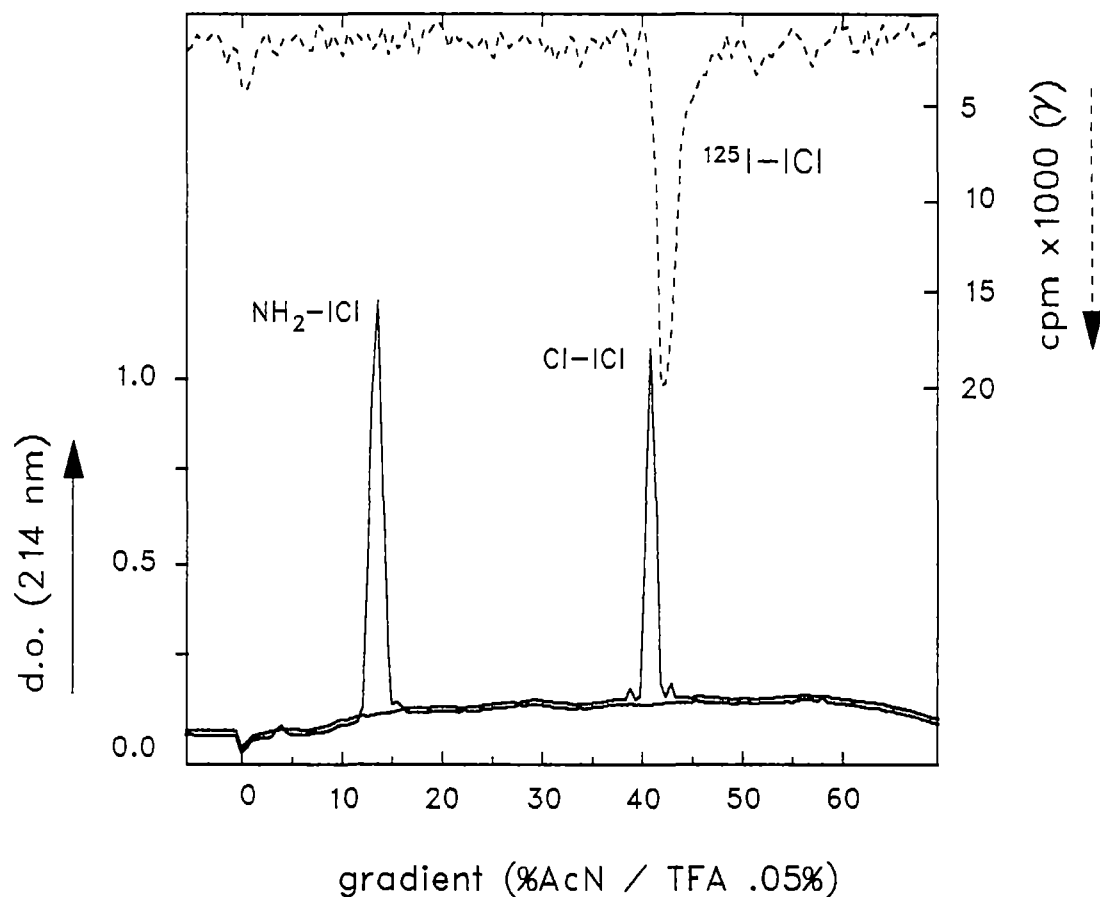


Figure 28. Iodation du N-méthyl-N-[(1R,S)-1-(3-aminophényl)-2-(1-pyrrolidinyl)éthyl]acétamide (M201163 ou NH₂-ICI) par la réaction de Gattermann/Sandmeyer.

Co-élution en HPLC du mélange réactionnel d'une iodation du NH₂-ICI en compagnie du NH₂-ICI et son analogue chloré le Cl-ICI. La densité optique et le niveau de radioactivité sont représentés en ordonnée alors que le gradient d'acétonitrile est indiqué en abscisse. Une espèce radioactive co-élue à proximité du Cl-ICI, il s'agit de ¹²⁵I-ICI.

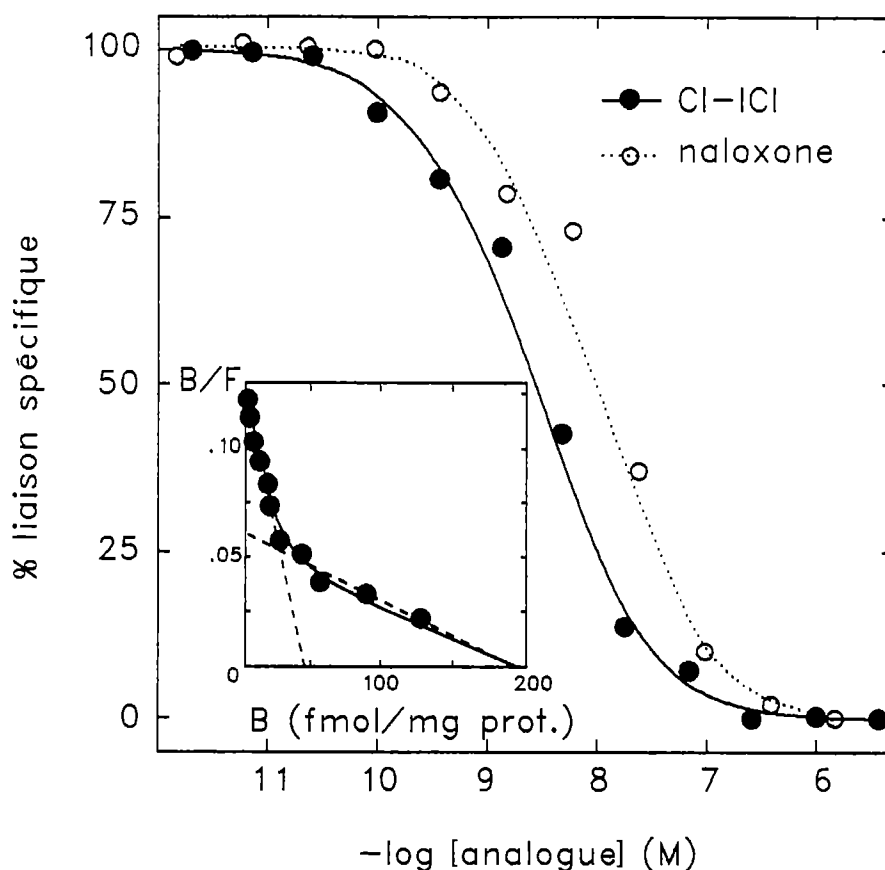


Figure 29. Essais de liaison (déplacement et saturation) du ^{125}I -ICI sur membranes de cerveaux de cobayes.

Courbes de déplacement du ^{125}I -ICI par le CI-ICI (courbe pleine) et le naloxone (courbe pointillée). Le pourcentage de liaison spécifique du traceur est présenté en ordonnée alors qu'en abscisse se retrouve la concentration des analogues servant au déplacement. Le ^{125}I -ICI est déplaçable par le CI-ICI et le naloxone sur des membranes de cerveau de cobaye. En utilisant 500 g de protéine, la liaison totale fut d'environ 17% dont près de 13% était spécifique. La liaison du ^{125}I -ICI aux récepteurs opiacés est saturable à en juger par la courbe de Scatchard présentée en encart. Puisque le tracé est curviligne, le radioligand semble toucher deux populations de récepteurs. La liaison totale (B.max.) s'établit à 187 fmol/mg prot. Les constantes d'affinité (K_d) du radioligand sont de 0.5 nM (B.max.45 fmol/mg prot.) pour le site à haute affinité et de 3 nM (B.max.142 fmol/mg prot.) pour le site de basse affinité. Chaque courbe est représentative d'une série de 3 déterminations menées distinctement. Chaque point résulte de la moyenne d'au moins 2 lectures.

à première vue monophasique, couvre plus de 3 unités logarithmiques. Le IC_{50} du CI-ICI est de 2.5 nM. La courbe de Scatchard, présentée en médaillon, est issue d'une expérience de saturation. On y voit que le ^{125}I -ICI se lie à 2 populations de récepteurs: des récepteurs à haute affinité ($K_d = 0.4$ nM, 45 fmol/mg prot) et des récepteurs à basse affinité ($K_d = 3$ nM, 142 fmol/mg prot.) (annexe 1g). Lorsque 100000 CPM de radioligand est employé avec 500 μ g de protéine (cerveaux de cobaye), la liaison totale du ^{125}I -ICI est d'environ 17-20% dont 12-15% est spécifique. Des essais de liaison avec le ^{125}I -ICI ont été entrepris sur des membranes de cerveaux de rats et de lapins mais aucune liaison spécifique interprétable n'a été obtenue (résultats non-inclus). La radioactivité spécifique moyenne du ^{125}I -ICI s'établit à 1500 Ci/mmol.

(K) Caractérisation des sites récepteurs des opiacés par essai de liaison du naloxone sur membranes de cerveaux de rats.

La caractérisation des récepteurs opiacés du cerveau de rat s'est faite par des essais de liaison (saturation et déplacement) de naloxone. La figure 30 nous montre des résultats représentatifs impliquant le naloxone. Le déplacement du 3H -naloxone par le naloxone s'effectue sur plus de 3 unités logarithmique et apparaît à première vue monophasique. L' IC_{50} du naloxone est dans ce cas de 1.5 nM. La courbe de Scatchard présentée en médaillon est curviligne. Elle caractérise deux populations de récepteurs: une à haute affinité ($K_d = 0.48$ nM, B.max. ≈ 50 fmol/mg prot.) et l'autre à basse affinité ($K_d = 4.16$ nM, B.max. ≈ 100 fmol/mg prot.) (annexe 1h). La courbe de Scatchard est le produit d'une étude de saturation. En utilisant 10000 CPM de radioligand et 500 μ g de protéine (membranes), la liaison totale est de l'ordre de

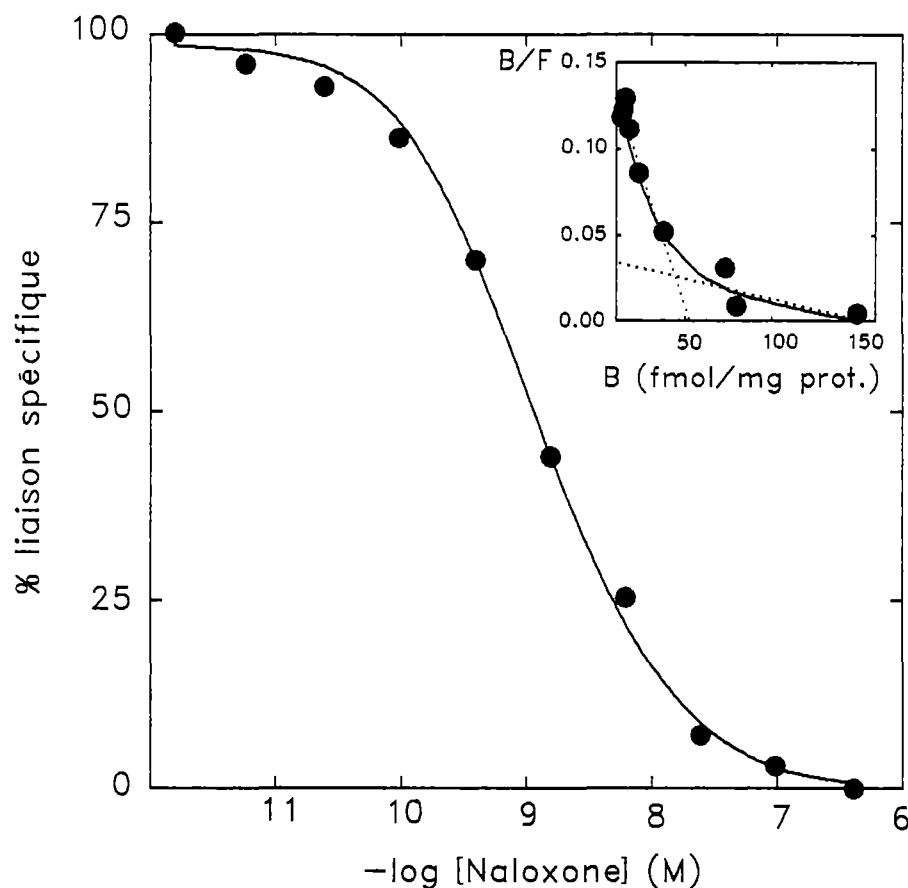


Figure 30. Essais de liaison (déplacement et saturation) du ^3H -naloxone sur membranes de cerveaux de rats.

Courbes de déplacement du ^3H -naloxone par le naloxone. Le pourcentage de liaison spécifique du traceur est présenté en ordonnée alors qu'en abscisse se retrouve la concentration du naloxone servant au déplacement. Le ^3H -naloxone est complètement déplacé par le naloxone à une concentration de $1 \mu\text{M}$. En utilisant $500 \mu\text{g}$ de protéines, la liaison totale fut d'environ 13% dont près de 12% était spécifique. La liaison du ^3H -naloxone aux récepteurs opiacés est saturable à en juger par la courbe de Scatchard présentée en encart. Le radioligand semble toucher deux populations de récepteurs à en juger par l'aspect curviligne du tracé. La liaison totale (B_{max}) s'établit à environ 150 fmol/mg protéine. Les constantes d'affinités (K_d) du ^3H -naloxone sont de 0.48 nM ($B_{\text{max}} \approx 50 \text{ fmol/mg prot.}$) pour le site à haute affinité et de 4.16 nM ($B_{\text{max}} \approx 100 \text{ fmol/mg prot.}$) pour le site de basse affinité. Chaque courbe est représentative d'une série de 3 déterminations menées distinctement. Chaque point résulte de la moyenne d'au moins 2 lectures.

13-15% dont 12-13% est spécifique.

(L) Iodation de la [NO₂-Phe⁵]BK (NO₂-BK) par la réaction de Gattermann/Sandmeyer et essais de liaison du radioligand obtenu.

Le marquage de la NO₂-BK a permis l'obtention de la [¹²⁵I-Phe⁵]BK (¹²⁵I-BK) avec un rendement moyen de 43%. Un profil d'élution représentatif du mélange réactionnel (γ) et de certains analogues de la BK est présenté à la figure 31. Une espèce radioactive co-élue avec la [I-Phe⁵]BK (I-BK), il s'agit vraisemblablement de ¹²⁵I-BK. Un échantillon de la fraction contenant la ¹²⁵I-BK a été co-injecté sur HPLC en présence de I-BK dans un second système de solvants (HCl-NaCl) et une co-élution a aussi été obtenue (non-montré). L'analyse des produits de réduction d'un mélange de I-BK et de ¹²⁵I-BK nous permet d'observer la production de BK (à partir du I-BK) et de ¹²⁵I libre (non-montré). Ces observations constituent une solide preuve de l'obtention du produit correctement iodé. Le log du coefficient de partition de la ¹²⁵I-BK se chiffre à 0.39. Des essais de liaison ont été entrepris avec le composé marqué et des résultats représentatifs sont présentés aux figures 32 et 33. Tel qu'observable à la figure 32, la ¹²⁵I-BK est complètement déplacée par la I-BK, la BK et la NO₂-BK sur une préparation membranaire d'iléon de cobaye. La [des-Arg⁹]BK ne suscite pas de déplacement significatif de la ¹²⁵I-BK à des concentrations allant jusqu'à 1 μM. La I-BK et la BK ont provoqué des déplacements biphasiques typiques d'une population hétérogène de récepteurs. Les IC₅₀ de la I-BK sont évalués à 3 (B≈80 fmol/mg prot.) et 1100 pM (B≈245 fmol/mg prot.) alors que ceux de la BK le sont à 17 pM (B≈70 fmol/mg prot.) et 375 pM (B≈255 fmol/mg prot.). Le déplacement suscité par la NO₂-BK est monophasique avec un IC₅₀ évalué

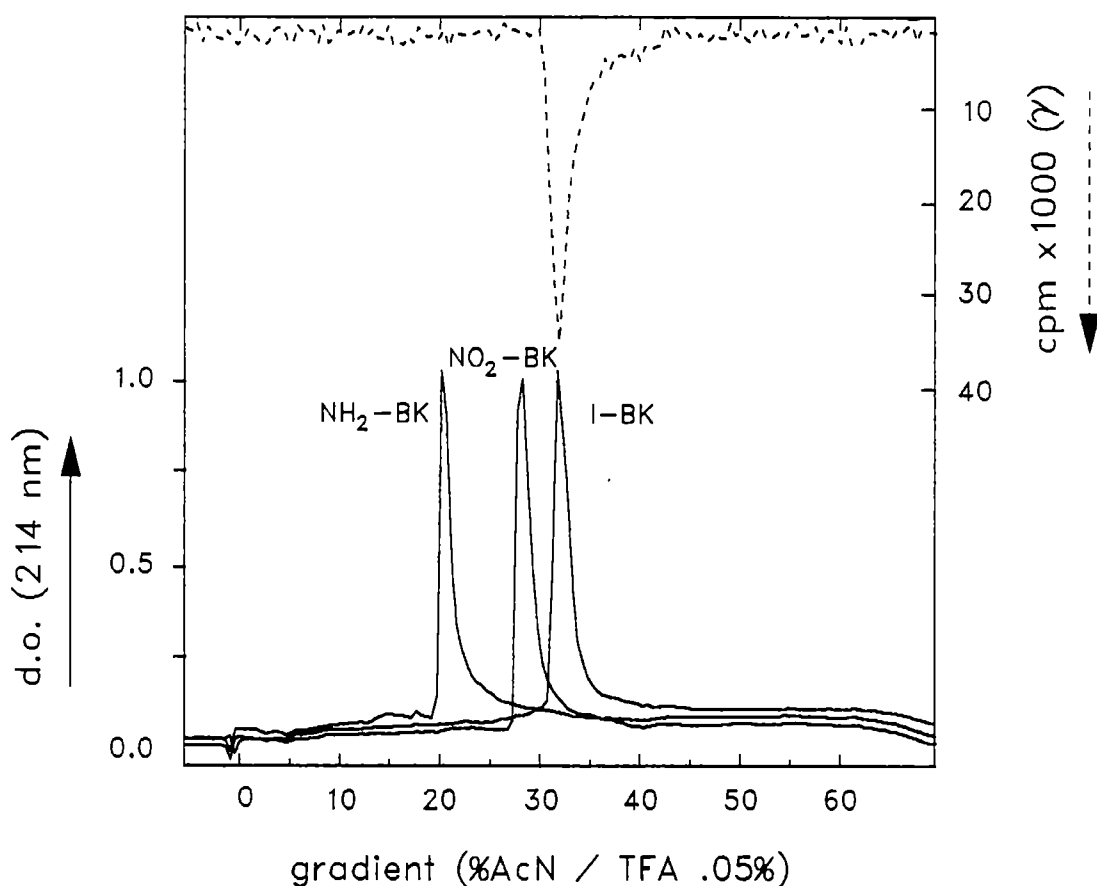


Figure 31. Iodation de la [NO₂-Phe⁵]BK (NO₂-BK) par la réaction de Gattermann /Sandmeyer.

Co-élution en HPLC du mélange réactionnel d'une iodation du NO₂-BK avec divers analogues de la BK substitués en position 5: [p-X-Phe⁵]BK où X= NO₂, NH₂ ou I. La densité optique et le niveau de radioactivité sont représentés en ordonnée alors que le gradient d'acétonitrile est indiqué en abscisse. Une espèce radioactive co-élue avec la [I-Phe⁵]BK (I-BK), il s'agit vraisemblablement de ¹²⁵I-BK.

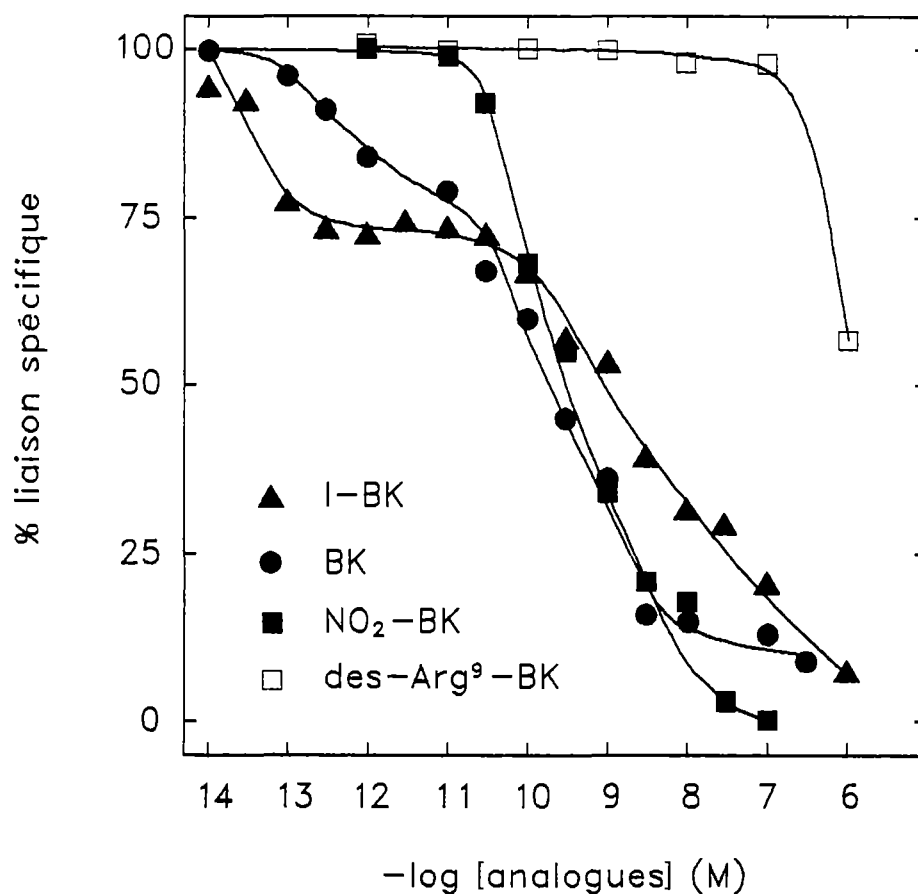


Figure 32. Essais de liaison (déplacement) de la [$^{125}\text{I-Phe}^5$]BK ($^{125}\text{I-BK}$) sur membranes d'iléons de cobayes.

Courbes de déplacement de la $^{125}\text{I-BK}$ par la BK et certains de ses analogues. Le pourcentage de liaison spécifique du traceur est présenté en ordonnée alors qu'en abscisse se retrouve la concentration des analogues de la BK. La BK et la I-BK produisent des déplacements biphasiques. La $\text{NO}_2\text{-BK}$ déplace la $^{125}\text{I-BK}$ de façon monophasique alors que la $[\text{des-Arg}^9]\text{BK}$ ne provoque aucun déplacement significatif. On estime les IC_{50} de la BK à 17 et 375 pM, ceux de la I-BK à 0.3 et 1100 pM et celui de la $\text{NO}_2\text{-BK}$ à 400 pM. Les expériences se sont effectuées à l'aide de 20-30 pM de $^{125}\text{I-BK}$ et 200-300 μg de protéine (membranes). Chaque courbe est représentative d'une série de 3 déterminations menées distinctement. Chaque point résulte de la moyenne d'au moins 2 lectures.

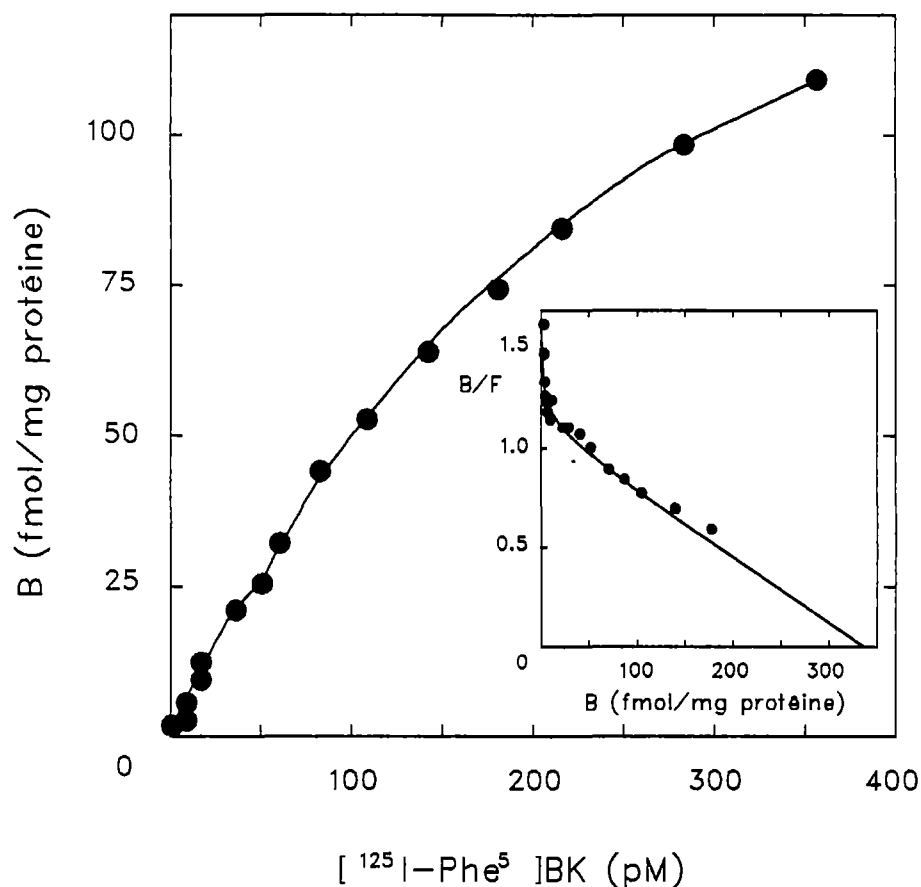


Figure 33. Essais de liaison (saturation) de la [¹²⁵I-Phe⁵]BK (¹²⁵I-BK) sur membranes d'iléons de cobayes.

La saturation s'est effectuée en incubant des concentrations croissantes de ¹²⁵I-BK (0.5 pM - 0.4 nM) avec 0.2-0.3 mg prot. de membranes d'iléon de cobaye. La liaison de la ¹²⁵I-BK aux récepteurs de la BK est saturable à en juger par la courbe de Scatchard présentée en médaillon. A la vue de ce tracé, le radioligand semble toucher deux populations de récepteurs. La liaison totale (B.max.) s'établit à 325 fmol/mg protéine. Chaque courbe est représentative d'une série de 3 déterminations menées distinctement. Chaque point résulte de la moyenne d'au moins 2 lectures.

à 400 pM (B.max. \approx 325 fmol/mg prot.). Une courbe de saturation et une courbe de Scatchard tirée de celle-ci sont présentées à la figure 33. L'utilisation de 50000 CPM (\approx 25 pM) de ^{125}I -BK et 200-300 g de protéines, engendre une liaison totale d'environ 30% dont plus de 25% est spécifique. La liaison de la ^{125}I -BK aux récepteurs de la BK est saturable à en juger par la courbe de Scatchard présentée en médaillon. A la vue de ce tracé, le radioligand semble toucher deux populations de récepteurs. La liaison totale (B.max.) s'établit à 325 fmol/mg protéine. Des essais biologiques ont été entrepris avec la BK et ses analogues I-BK et NO_2 -BK. La figure 34 nous montre que chaque analogue de la BK agit comme agoniste, suscitant la contraction maximale ($\alpha_E=1$) de l'iléon de cobaye. Chaque courbe concentration-réponse est monophasique et couvre environ deux unités logarithmiques. Les mesures d'affinité relative (ED_{50}) sont respectivement de 4,8 et 15 nM pour la BK, la NO_2 -BK et la I-BK. La radioactivité spécifique moyenne de la ^{125}I -BK s'établit à 1250 Ci/mmol.

(M) Iodation conventionnelle du $[\text{Sar}^1, \text{Val}^5, \text{Bpa}^8]\text{Ang}$ (Bpa-Ang) avec Iodo-Gen et essais de liaison du radioligand obtenu.

L'iodation du Bpa-Ang a permis l'obtention de $[\text{Sar}^1, ^{125}\text{I}\text{-Tyr}^4, \text{Val}^5, \text{Bpa}^8]\text{Ang}$ (^{125}I -Bpa-Ang) avec un rendement de 75%. Des aliquots de la fraction de plus haut compte récoltée lors du marquage a été co-injecté avec du Bpa-Ang (25 μl d'une solution 1 mM). Un chromatogramme représentatif est montré à la figure 35. Un pic sur l'échelle de radioactivité (γ) élue plus tard que le Bpa-Ang (U.V.), c'est le ^{125}I -Bpa-Ang. Un petit épaulement est perceptible à la droite du pic, il s'agit probablement diiodo- ^{125}I -Bpa-Ang. Le ^{125}I -Bpa-Ang fut employé en essais de liaisons sur des membranes de cortex surrénalien bovin. Des exemples représentatifs de ces

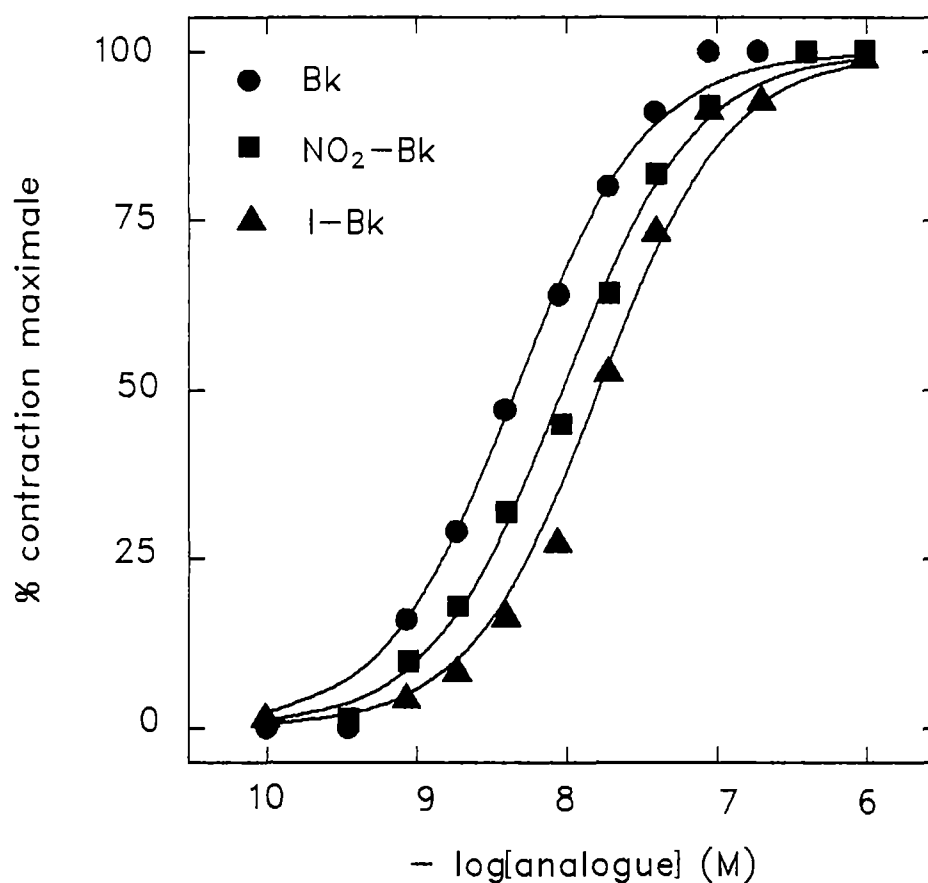


Figure 34. Essais biologiques (tensiométrie) de la BK, I-BK et $\text{NO}_2\text{-BK}$ sur des anneaux d'iléons de cobayes.

Courbes concentrations-réponses de la BK et de deux de ses analogues. Les courbes ont été constituées en enregistrant les contractions produites par l'addition de concentrations croissantes de chacun des agonistes utilisés. Toutes les réponses enregistrées font l'objet d'un rapport envers la réponse maximale suscitée par la BK. De là on obtient le pourcentage de la réponse maximale présentée en ordonnée. L'ordre de puissance des agonistes s'établit comme suit BK ($\text{ED}_{50}=4 \text{ nM}$) > $\text{NO}_2\text{-BK}$ ($\text{ED}_{50}=8 \text{ nM}$) > I-BK ($\text{ED}_{50}=15 \text{ nM}$). Les deux analogues de la BK ont produit des réponses maximales ($\alpha_E=1$). Chaque courbe est représentative d'une série d'au moins 3 déterminations menées distinctement.

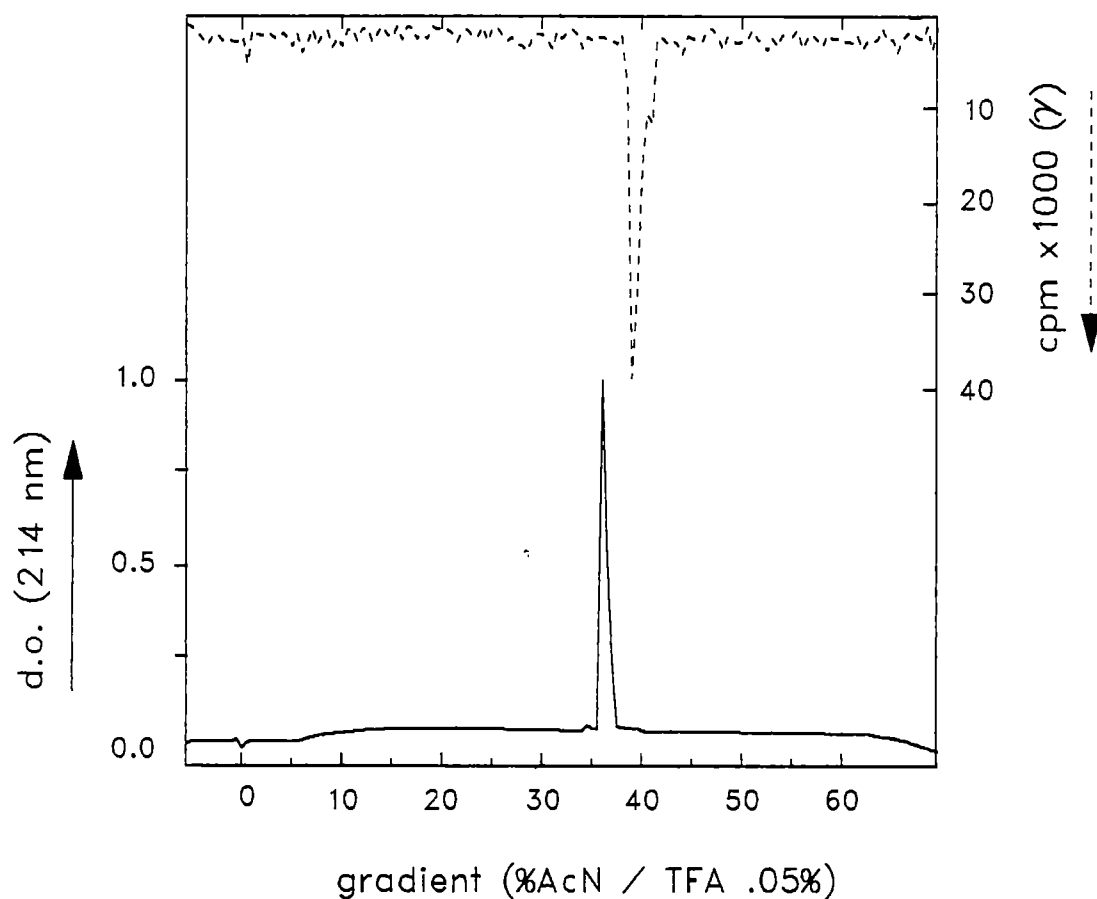


Figure 35. Chromatogramme d'une iodation conventionnelle du [Sar¹,Val⁵, Bpa⁸] Ang avec Iodo-Gen.

La densité optique et le niveau de radioactivité sont représentés en ordonnée alors que le gradient d'acétonitrile est indiqué en abscisse. Des aliquots de la fraction de plus haut compte récoltée lors du marquage a été co-injectée avec du Bpa-Ang (25 μ l d'une solution 1 mM). Le pic sur l'échelle de radioactivité (γ) élue plus tard que le Bpa-Ang (U.V.), il caractérise le ¹²⁵I-Bpa-Ang.

essais sont montrés à la figure 36. Le ^{125}I -Bpa-Ang est déplaçable par le $[\text{Sar}^1, \text{Val}^5, \text{D-Phe}^8]\text{Ang}$ (D-Phe⁸-Ang) et par le Bpa-Ang. Chaque courbe est monophasique et couvre un peu moins de 3 unités logarithmiques. Les IC_{50} sont de 2 nM pour le Bpa-Ang et de 6 nM pour le D-Phe⁸-Ang. La courbe de Scatchard présentée en médaillon est issue d'une expérience de saturation. Le tracé est rectiligne, montrant que le ^{125}I -Bpa-Ang se lie à une population homogène de récepteurs. Le K_d du radioligand évalué à partir de cette courbe se chiffre à 0.7 nM (annexe 1i). En utilisant 50000 CPM (≈ 175 pM) de ^{125}I -Bpa-Ang et 50 μg prot. de préparation membranaire, la liaison totale se chiffre à environ 40% dont près de 30% était spécifique. Utilisé à des concentrations allant jusqu'à 1 μM , le Bpa-Ang n'induit pas de contraction de l'aorte de lapin (non-montré). Cependant, le Bpa-Ang diminue l'effet contractile de l'Ang quand il est co-injecté avec celui-ci. La figure 37 nous montre des courbes concentrations-réponses représentatives de l'Ang en absence ou en présence de Bpa-Ang. Le ED_{50} de l'Ang se situe à 15 nM. En présence de 30, 50 et 70 nM de Bpa-Ang l' ED_{50} apparent de l'Ang augmente à des valeurs 30, 45 et 60 nM respectivement. L'activité intrinsèque (α_E) apparente de l'Ang subit une baisse en fonction de l'augmentation de la concentration de Bpa-Ang. A des concentrations de 30, 50 et 70 nM de Bpa-Ang, l' α_E apparent de l'Ang devient de 76, 48 et 26.5% respectivement. Il est à noter que chacune des courbes concentrations-réponses est monophasique et couvre un peu moins de deux unités logarithmiques. Le pA_2 du Bpa-Ang est évalué à l'aide d'un graphe de Hill (fig. 38) constitué par les données citées précédemment. On le chiffre à 7.54 ($\text{IC}_{50}=29$ nM). La radioactivité spécifique moyenne du ^{125}I -Bpa-Ang s'établit à 1750 Ci/mmol.

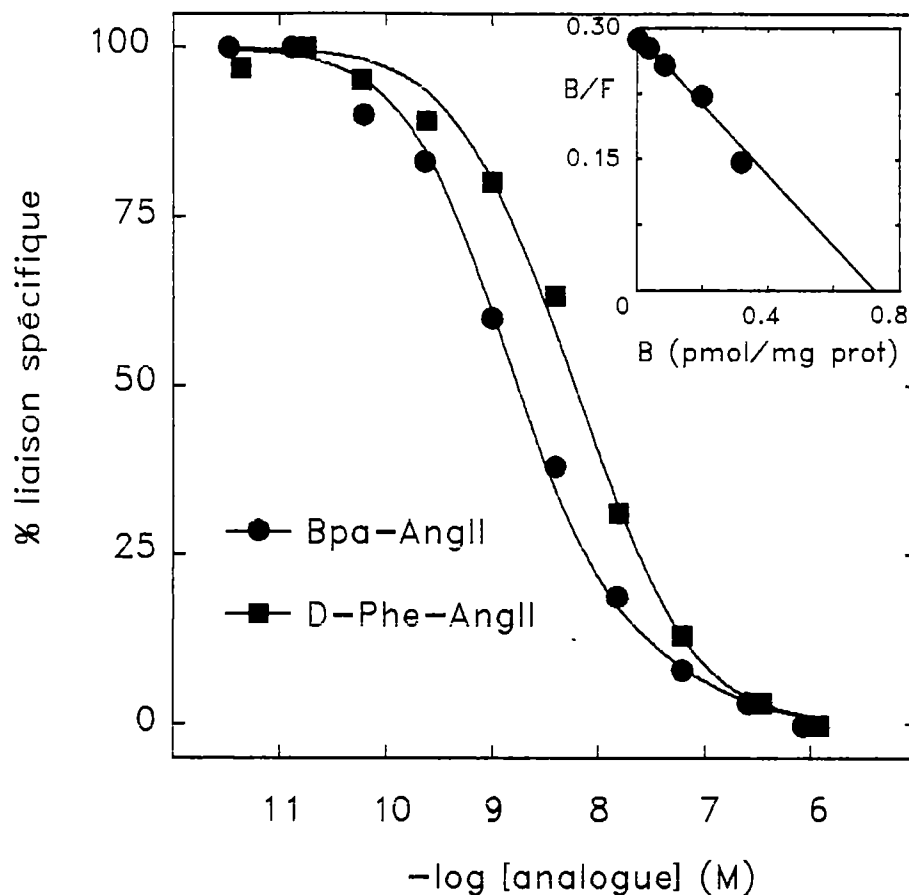


Figure 36. Essais de liaison (déplacement et saturation) du [Sar¹,¹²⁵I-Tyr⁴,Val⁵,Bpa⁸]Ang (¹²⁵I-Bpa-Ang) sur des membranes de cortex surrénalien bovin.

Courbes de déplacement de la ¹²⁵I-Bpa-Ang par le [Sar¹,Val⁵,D-Phe⁸]Ang (D-Phe-Ang) et le Bpa-Ang. Le pourcentage de liaison spécifique du traceur est présenté en ordonnée alors qu'en abscisse se retrouve la concentration des analogues de l'Ang. Le Bpa-Ang et le D-Phe-Ang produisent des déplacements monophasiques du ¹²⁵I-Bpa-Ang. Les courbes de déplacement couvrent moins de 3 unités logarithmiques. On estime le IC₅₀ du Bpa-Ang à 2 nM et celui du D-Phe-Ang à 6 nM. Les expériences se sont effectuées à l'aide de 200 pM de ¹²⁵I-Bpa-Ang et 50 µg de protéine (membranes). Une courbe de Scatchard présentée en médaillon provient d'une expérience de saturation. Le tracé rectiligne indique que le radioligand se lie à une population homogène de récepteurs. On évalue son Kd à 0.7 nM. Chaque courbe est représentative d'une série de 3 déterminations menées distinctement. Chaque point résulte de la moyenne d'au moins 2 lectures.

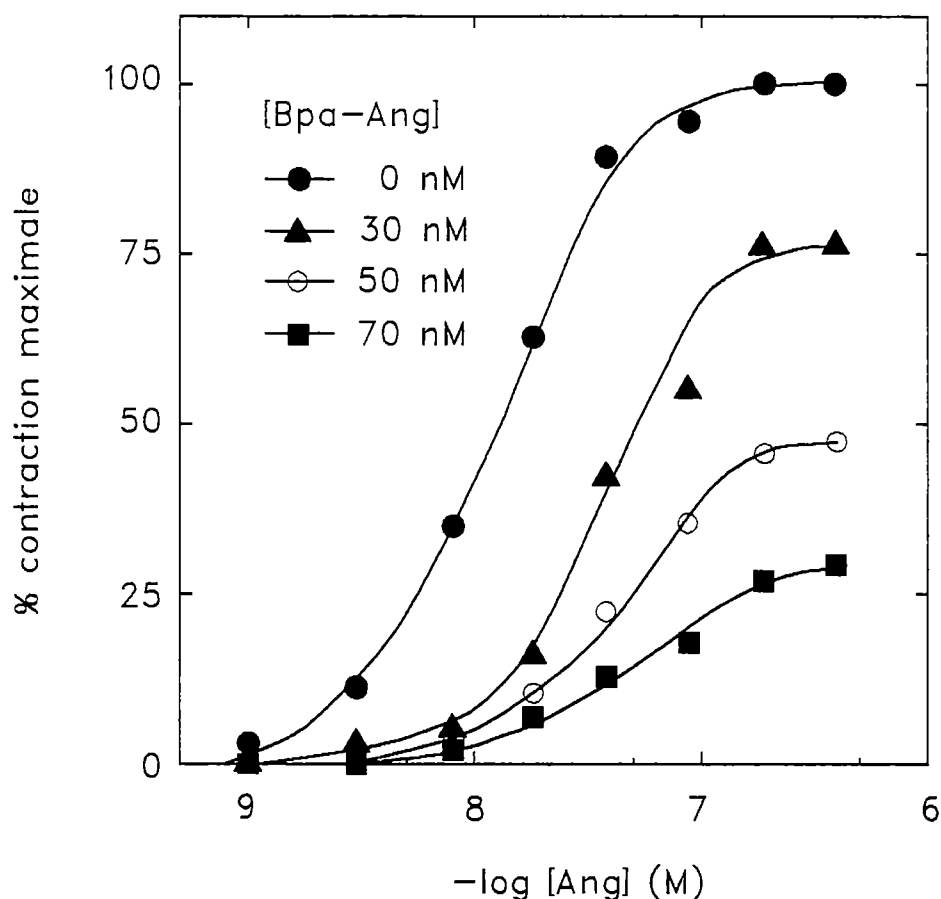


Figure 37. Essais biologiques (tensiométrie) du Bpa-Ang sur des bandelettes d'aorte de lapin.

Courbes concentrations-réponses de l'Ang en absence ou en présence de Bpa-Ang (30,50 et 70 nM). Les courbes ont été constituées en enregistrant les contractions produites par l'addition de concentrations croissantes d'Ang. Toutes les réponses enregistrées font l'objet d'un rapport envers la réponse maximale suscitée par l'Ang seule. De là on obtient le pourcentage de la réponse maximale présentée en ordonnée. L'activité intrinsèque (α_E) apparente de l'Ang diminue en fonction de l'augmentation de la concentration de Bpa-Ang. Le ED_{50} apparent de l'Ang augmente en fonction d'une hausse de la concentration de Bpa-Ang. Chaque courbe est monophasique et couvre moins de deux unités logarithmiques. Chaque courbe est représentative d'une série d'au moins 3 déterminations différentes.

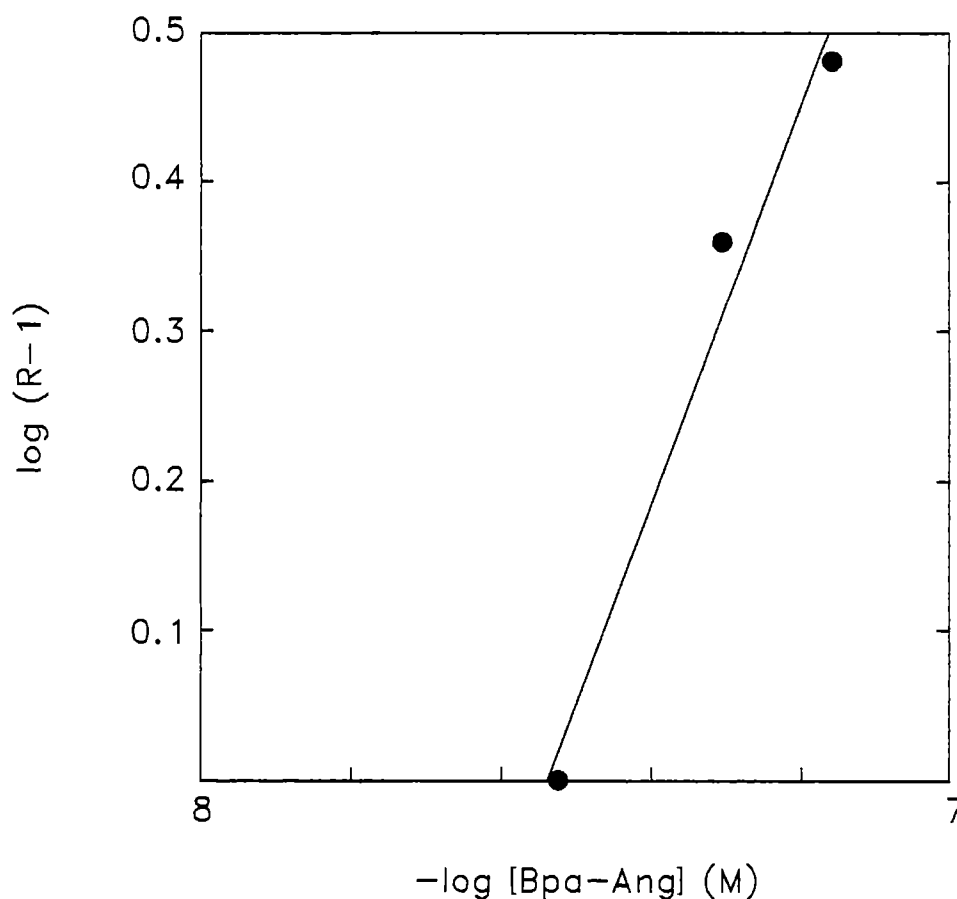


Figure 38. Mesure du pA_2 du Bpa-Ang à l'aide d'un graphique de Hill.

Le logarithme de $(r-1)$ est présenté en ordonnée et le logarithme négatif de la concentration de Bpa-Ang en abscisse. Le coefficient "r" s'exprime comme le rapport des ED_{50} apparents de l'Ang ($[\text{Bpa-Ang}] \neq 0$) sur son ED_{50} absolu ($[\text{Bpa-Ang}] = 0$). L'abscisse à l'origine de la régression linéaire indique un pA_2 de 7.54 ($IC_{50} = 29 \text{ nM}$).

(N) Iodation du PD123177 par la réaction de Gattermann/Sandmeyer et essais de liaison du radioligand obtenu.

L'iodation du PD123177 fut d'abord pratiquée dans le H_2SO_4 1N pendant 3 heures à 65°C. Le chromatogramme de la purification du mélange réactionnel est présenté à la figure 39 (panneau de gauche). Les deux fractions de plus hauts comptes, appelées A et B, furent retenues et des aliquots de ces dernières ont été co- injectées en présence de PD123177 sur HPLC analytique (figure 39, panneau de droite). Les deux produits iodés éluent avant le PD123177.

Avant d'évaluer ces produits par essais de liaison, nous avons vérifié la présence de récepteurs de type AT_2 dans notre préparation membranaire de cortex surrénalien bovin. La figure 40 nous montre la variation de la liaison totale du $[\text{Sar}^1, ^{125}\text{I-Tyr}^4, \text{Val}^5, \text{D-Phe}^8]\text{Ang}$ ($^{125}\text{I-D-Phe-Ang}$) en fonction de l'absence ou de la présence de D-Phe-Ang ou des ligands sélectifs L-158,809 (AT_1) et PD123177 (AT_2). Les barres représentent le rapport la quantité totale de traceur lié aux membranes (Lt) sur la quantité initiale utilisée (total). Ces valeurs représentent la moyenne de 10 lectures indépendantes. En absence de compétiteur, la liaison totale du radioligand fut de 9.6%. En présence d'une concentration saturante de D-Phe-Ang, la liaison non-spécifique s'établit à 0.9%. La liaison spécifique, obtenue par différence de la liaison totale et de la liaison non-spécifique, se chiffre à 8.7%. En présence d'une concentration saturante de L-158,809, seuls les sites AT_2 demeurent exposés. La liaison totale obtenue est de 2.8% indiquant une liaison spécifique aux récepteurs AT_2 de l'ordre de 1.9%. En présence d'une concentration saturante de PD123177, seuls les sites AT_1 demeurent accessibles. La liaison totale observée dans

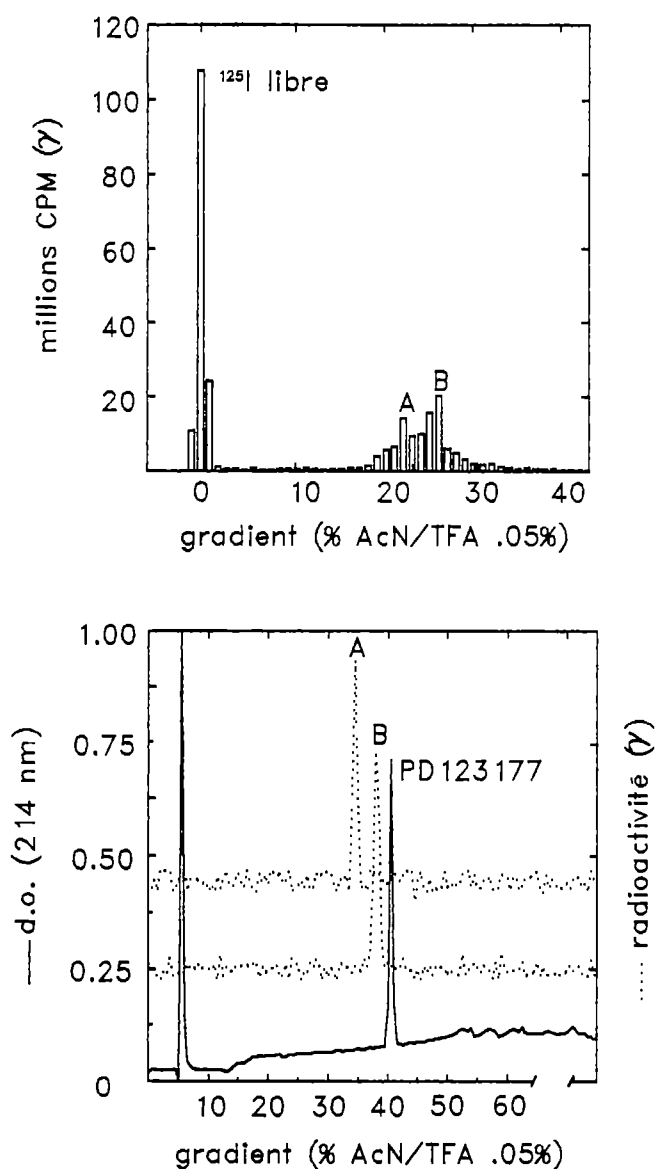


Figure 39. Iodation du PD123177 par la réaction de Gattermann/Sandmeyer tenue à 65°C pendant 3 heures.

La densité optique (panneau du haut seulement) et le niveau de radioactivité sont représentés en ordonnée alors que le gradient d'acétonitrile est indiqué en abscisse. Panneau du haut: chromatogramme de la purification du mélange réactionnel. Les deux fractions de plus hauts comptes, appelées A et B, furent retenues. Panneau du bas: Des aliquots des fractions A et B ont été co-injectées en présence de PD123177 sur HPLC analytique. Les deux produits iodés éluent avant le PD123177.

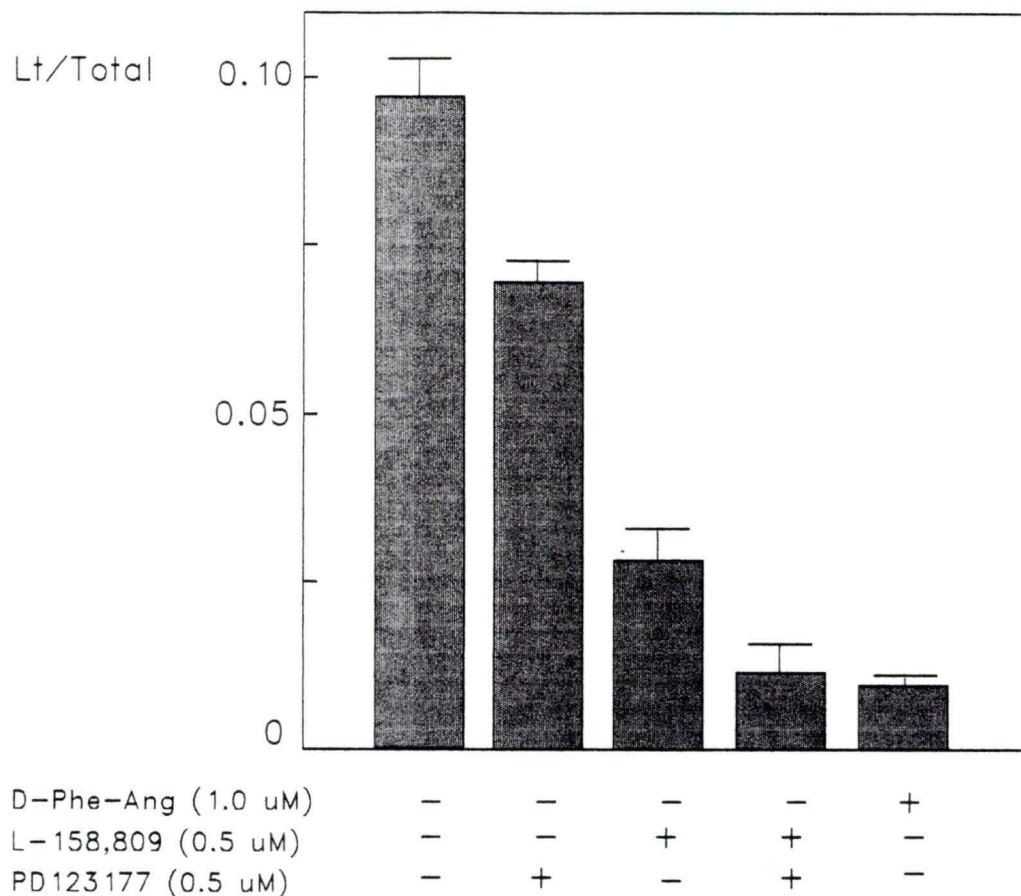


Figure 40. Analyse des populations de sous-types de récepteurs AT₁ et AT₂ sur des membranes de cortex surrénalien bovin.

Variation de la liaison totale du [Sar¹, ¹²⁵I-Tyr⁴, Val⁵, D-Phe⁸]Ang (¹²⁵I-D-Phe-Ang) en fonction de l'absence ou de la présence de D-Phe-Ang ou des ligands sélectifs L-158,809 (AT₁) et PD123177 (AT₂). Les barres représentent le rapport de la quantité totale de traceur lié aux membranes (Lt) sur la quantité initiale utilisée (total). En présence d'une concentration saturante de L-158,809, seuls les sites AT₂ demeurent exposés alors qu'en présence d'une concentration saturante de PD123177, seuls les sites AT₁ demeurent accessibles. Les résultats indiquent une proportion de récepteur AT₁ de l'ordre de 70-75% et de récepteur AT₂ de 20-25%. Les essais se sont effectués à l'aide 50,000 CPM du traceur et de 50 µg prot. de membranes dans un volume de 200 µl. Chaque barre représente la moyenne de 10 lectures indépendantes.

ce cas est de 7.0% indiquant une liaison spécifique aux récepteurs AT₁ de l'ordre de 6.1%. En faisant le rapport de la liaison spécifique imputable à chacun des sous-types de récepteurs sur la liaison spécifique du ¹²⁵I-Ang, nous pouvons trouver les proportions respectives de récepteurs de types AT₁ et AT₂. Ces proportions sont de 70% pour l'AT₁ (6.1/8.7) et de 22% (1.9/8.7) pour l'AT₂. Il est à noter que l'addition simultanée de concentrations saturantes de PD123177 et de L-158,809 déplace le ¹²⁵I-D-Phe-Ang à niveau identique à celui d'une concentration saturante de D-Phe-Ang.

Chacune des fractions du PD123177 marqué a été examinée lors d'essais de liaison sommaires sur membranes de cortex surrénalien bovin. Les résultats sont présentés à la figure 41. 50000 CPM de chaque fraction ont été incubés seuls ou en présence de 10 µM de PD123177 ou d'Ang. Les valeurs des rapports B/T ne diffèrent pas significativement. Aucune des fractions du composé iodé n'est déplaçable par l'Ang ou le PD123177.

Le marquage a été repris avec des conditions différentes: 4°C pendant 10 heures. Un chromatogramme montrant la co-injection d'un aliquot des fractions A et B (du mélange réactionnel) en compagnie du PD123177 apparaît à la figure 42. La fraction correspondant au composé iodé éluant après le PD123177 (34% du gradient) fut retenue. L'analyse des produits de réduction d'un mélange de I-PD123177 et de ¹²⁵I-PD123177 nous permet d'observer la production d'un dérivé dont l'hydrophobicité se situe entre celle du PD123177 et celle du I-PD123177. On observe aussi l'apparition de ¹²⁵I libre (non-montré). Ces observations nous suggèrent l'obtention d'un produit correctement iodé. Le log du coefficient de partition du ¹²⁵I-PD123177

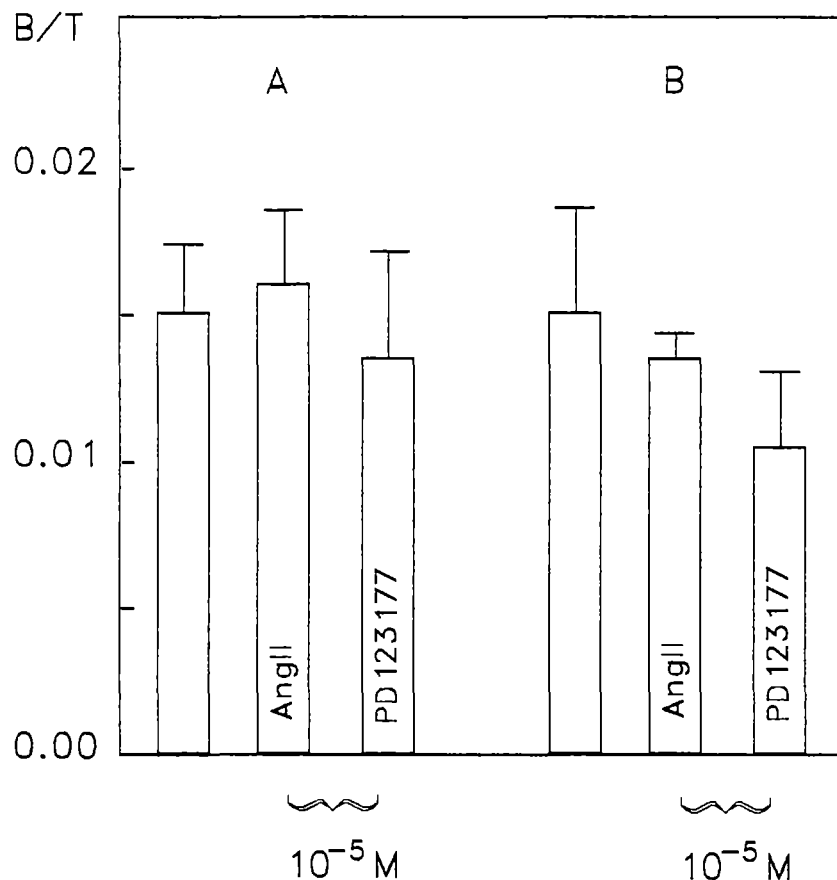


Figure 41. Essais de liaison sur membranes de cortex surrénalien bovin des fractions A et B obtenues par iodation du PD123177 via une réaction de Gattermann/Sandmeyer tenue à 65°C pendant 3 heures.

Les essais se sont tenus à l'aide de 50000 CPM de chacun des aliquots, incubés seuls ou en présence de 50 μ M de PD123177 ou [Sar¹,Val⁵,D-Phe⁸]Ang (D-Phe-Ang). Le coefficient B/T est le rapport de la quantité totale en CPM de radioligand lié aux membranes (B) sur la quantité initiale en CPM (T) de radioligand utilisé. Les bâtonnets ne portant aucune inscription représentent les essais où les radioligands furent incubés seuls avec les membranes. Pour chacune des fractions, aucune différence significative n'est observée entre les incubations tenues en absence et en présence de compétiteurs (D-Phe-Ang ou PD123177). Chaque bâtonnet représente la moyenne de 5 lectures. L'expérience est représentative d'une série de 3 déterminations différentes.

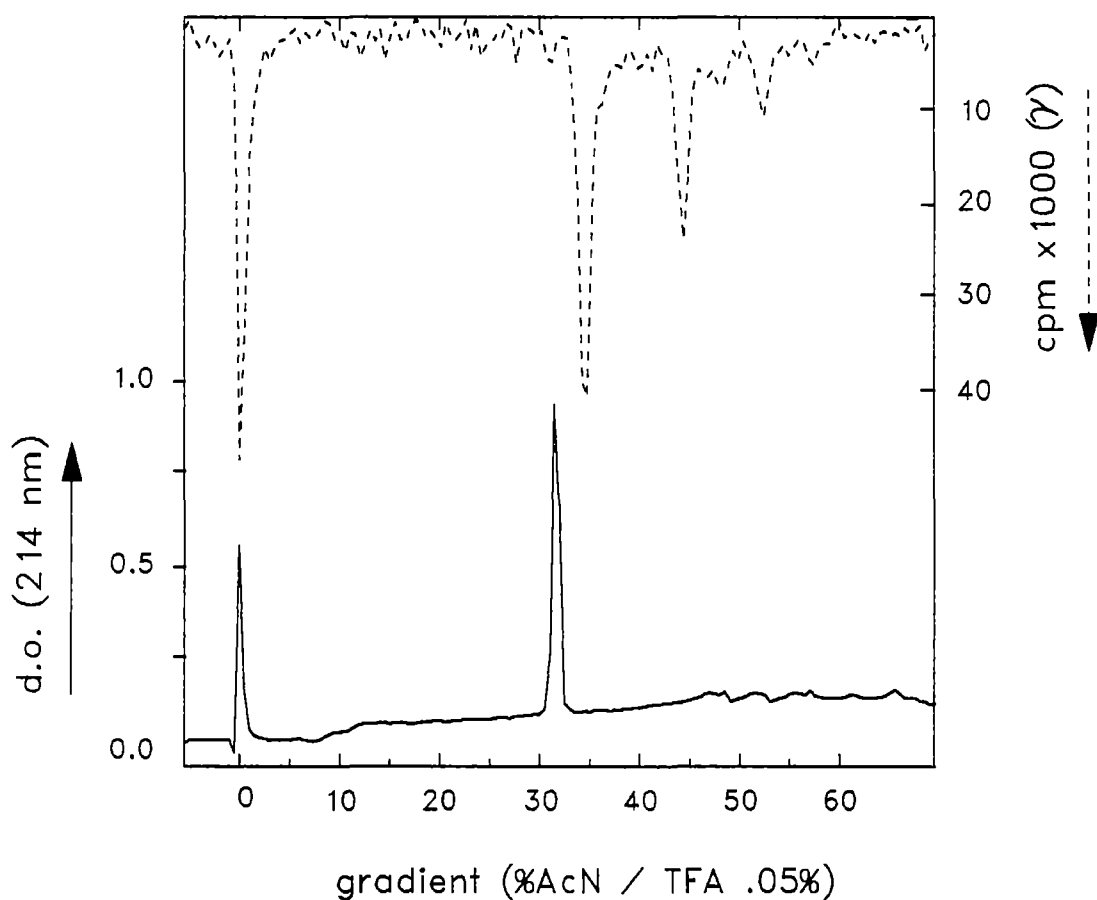


Figure 42. Iodation du PD123177 par la réaction de Gattermann/Sandmeyer tenue à 4°C pendant 10 heures.

La densité optique et le niveau de radioactivité sont représentés en ordonnée alors que le gradient d'acétonitrile est indiqué en abscisse. Chromatogramme montrant la co-injection d'un aliquot des fractions A et B (mélange réactionnel) en compagnie du PD123177. La fraction correspondant au composé iodé éluant après le PD123177 (34% du gradient) fut retenue.

se chiffre à 1.59. Un essai de liaison sommaire sur préparation membranaire de cortex surrénalien bovin fut fait. Les résultats (rapports B/T significativement différents, non-montrés) indiquèrent un déplacement significatif du composé marqué par le [Sar¹,Val⁵,D-Phe⁸]Ang (D-Phe-Ang). Des expériences de déplacement du produit iodé, appelons-le ¹²⁵I-PD123177, par le D-Phe-Ang furent alors entrepris. Un exemple représentatif de ces essais est présenté à la figure 43. Le ¹²⁵I-PD123177 est déplacé par le D-Phe-Ang avec un IC₅₀ de 70 nM. Le déplacement est monophasique et couvre environ 3 unités logarithmiques. On doit noter un écart-type important sur chacun des points expérimentaux. Cette variation importante du signal fut présente lors des six expériences menées à ce sujet. En utilisant 25000 CPM du radioligand et 250 µg prot. de préparation membranaire de cortex surrénalien bovin, la liaison totale du radioligand fut d'environ 13% dont 4% était spécifique (déplacée par le D-Phe-Ang).

(O) Etude scintigraphique de la biodistribution des composés marqués au ¹³¹I.
Tous les marquages ont été réalisés de façon habituelle exception faite de la tyrosine qui a été iodée à l'Iodo-Gen. Les rendements varièrent de 30 à 55%. Les contrôles par HPLC donnèrent, pour chaque composé, des résultats analogues à ceux obtenus lors des iodations au ¹²⁵I.

Interprétation des images digitalisées

Les images digitalisées utilisent un code de couleur variant du noir au blanc. Chaque transition de niveau de coloration représente une augmentation de l'intensité de la

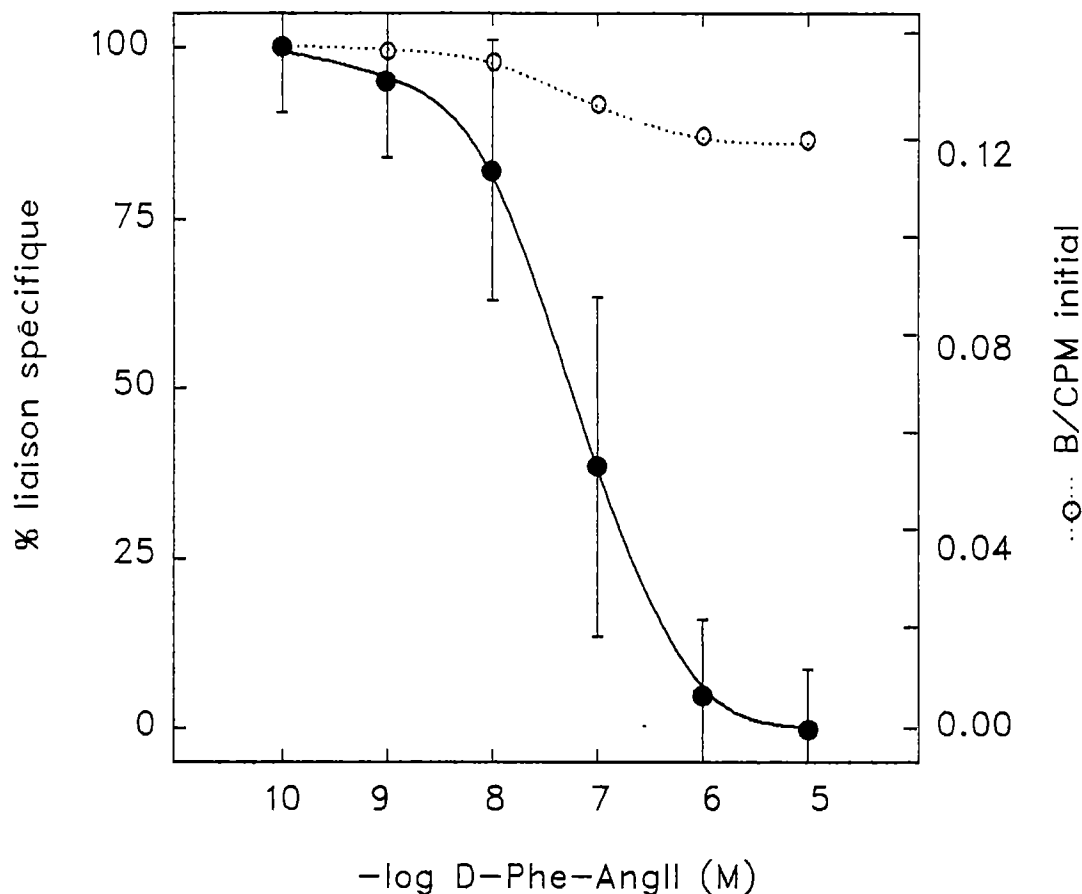
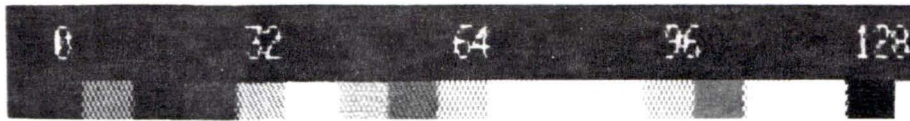


Figure 43. Essais de liaison sur membranes de cortex surrénalien bovin de la fraction de plus haut compte obtenue suite à l'iodation du PD123177 via une réaction de Gattermann/Sandmeyer tenue à 4°C pendant 10 heures.

Courbe de déplacement du ^{125}I -PD123177 par le D-Phe-Ang. Le pourcentage de liaison spécifique du traceur est présenté en ordonnée de gauche alors qu'en ordonnée de droite se trouve le ratio du ^{125}I -DALDA lié (B) sur la quantité initiale (CPM initial) de ce traceur utilisée. En abscisse se retrouve la concentration du D-Phe-Ang. Le ^{125}I -PD123177 est déplacé par le D-Phe-Ang avec un IC_{50} de 70 nM. Le déplacement est monophasique et couvre environ 3 unités logarithmiques. La liaison du ^{125}I -PD123177 comporte un haut niveau de non-spécificité. En divisant la valeur du rapport "B/CPM initial" à 10 μM de D-Phe-Ang (0.12) par celle à 0.1 nM (0.145) nous évaluons la liaison non spécifique à 80%. On doit noter un écart-type important sur chacun des points expérimentaux. La courbe est représentative d'une série de 6 déterminations menées distinctement. Chaque point résulte de la moyenne de 3 lectures.

radioactivité par un facteur 8:



Par différence des niveaux d'intensité relative, on peut comparer les niveaux de radioactivité des zones d'intérêts (eg. organes cibles). Par exemple, une zone rouge pure (intensité relative=104) sera 64 fois plus radioactive qu'une zone bleue pure (intensité relative=40). Chaque courbe de clairance (ou d'accumulation) est faite par quantification des comptes d'une zone uniforme d'un organe. Cette zone a une surface de 100 pixels (petits points sur l'image), représentant en terme réel, environ 1 cm² sur le lapin. A titre informatif, le collimateur utilisé pour les enregistrements, différencie significativement 2 pixels de même intensité à condition qu'ils soient distants par au moins 5 mm.

Identification des repères anatomiques.

La figure 44 nous présente la biodistribution hâtive du ^{m99}Tc-pyrophosphate après 2.5 minutes. Les zones d'intérêts sont les organes hautements vascularisés. On distingue d'abord le coeur (vert→jaune) et sous celui-ci le foie (jaune→rouge→blanc). La zone rouge à l'extrémité inférieure antérieure du foie est la rate. Les reins sont aussi bien visibles. On y distingue le cortex (jaune), les pyramides de la zone médullaire (blanc) et les calices majeurs (bleu pâle). Une accumulation osseuse est aussi perceptible aux hanches et aux genoux (os iliaques, fémurs et tibias). A une heure post-injection (p.i.), les organes sont moins radioactifs mais une bonne accumulation osseuse est visible, surtout chez les tibias, fémurs, os



Figure 44. Biodistribution du ^{99m}Tc -pyrophosphate 2.5 min. p.i.

Les zones d'intérêt sont les organes hautement vascularisés: coeur, foie et reins.

iliaques et à l'axe sterno-claviculaire (fig.45). Le marquage des globules rouges au ^{99m}Tc permet une bonne identification du pool sanguin. La figure 46 présente la distribution des globules rouges 2.5 et 5 minutes post-injection. Les organes très vascularisés sont facilement identifiables: le coeur, le foie et la rate. Les reins sont aussi visibles. Une zone particulièrement active correspondant à la situation anatomique du pancréas et/ou de la vésicule biliaire est observable à l'extrémité inférieure postérieure du foie. La zone radioactive (point rouge) à l'extrémité supérieure droite de l'image est le site d'injection des globules rouges marqués, soit une veine marginale de l'oreille.

Mobilisation thyroïdienne du ^{131}I et vérification de l'activité des désiodases face aux acides aminés marqués.

Des dose d'environ 200 μCi de Na^{131}I ont été administrées par voie intraveineuse (i.v.) à des lapins. On observe à la figure 47 que le ^{131}I est rapidement mobilisé par la thyroïde. Des sites de dépôt moins importants sont notés dans la région hépatique ainsi que dans la vessie. 25% de la dose initiale de ^{131}I se retrouve dans la thyroïde après 24 heures (fig. 48). Une intense activité de désiodation de la tyrosine marquée (^{131}I -Tyr) se traduit par une importante accumulation thyroïdienne de ^{131}I et ce, dès 6 heures p.i.(fig.48). Près de 15% de la dose initiale est mobilisé par la thyroïde sous forme de ^{131}I (fig.49). On note encore la présence de radioactivité dans la vessie. L'analyse de l'urine récoltée après 3 heures démontre l'unique présence d'iode libre (fig.50). Aucune mobilisation thyroïdienne significative de ^{131}I n'est cependant notée suite à l'administration de phénylalanine iodée (^{131}I -Phe, fig.48 et 51). Une intense activité est notée dans la vessie dès les premières heures

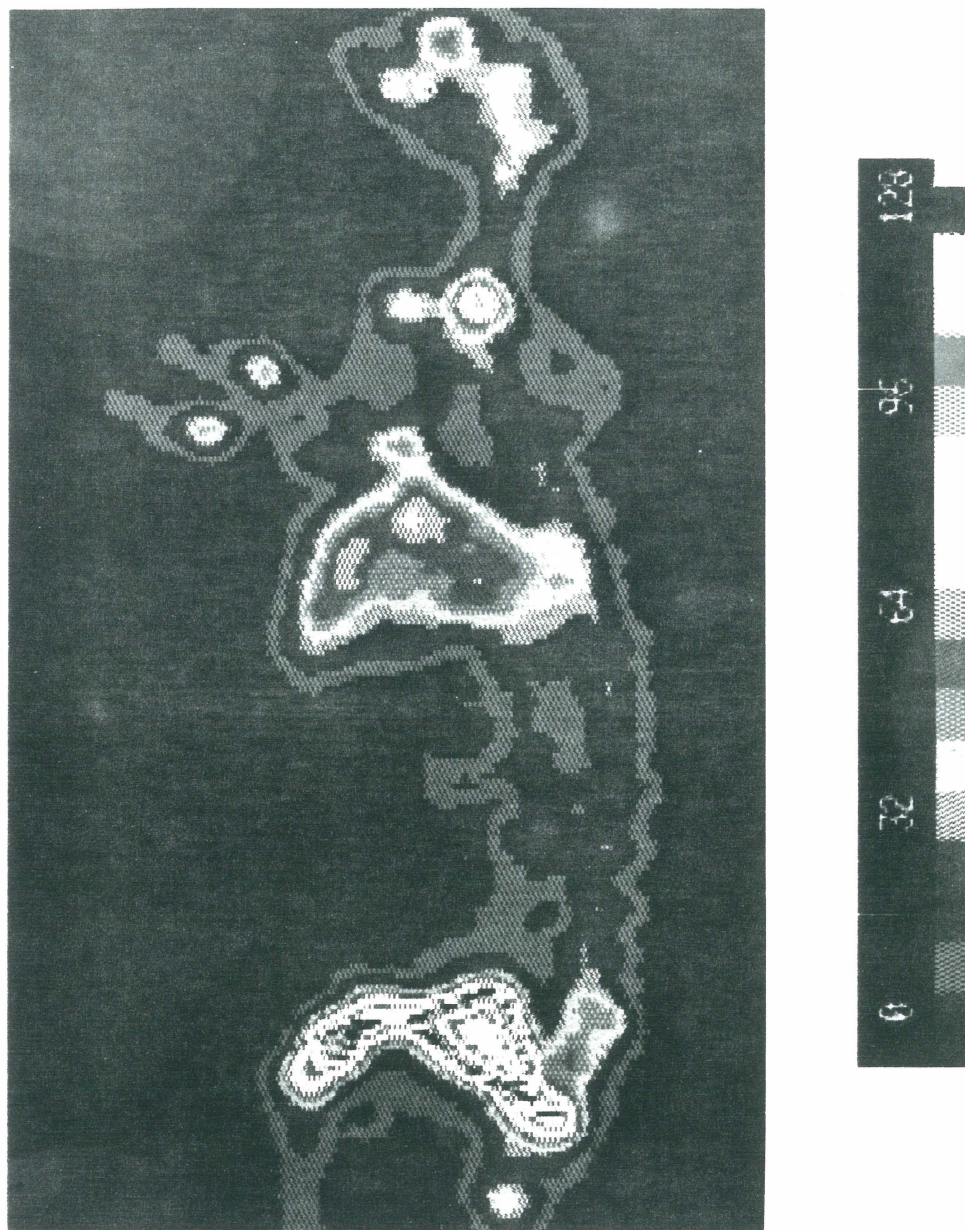


Figure 45. Biodistribution du ^{99m}Tc -pyrophosphate à 1 heure p.i.

A une heure post-injection (p.i.), les organes sont moins radioactifs mais une bonne accumulation osseuse est visible, surtout chez les tibias, fémurs, os iliaques et à l'axe sterno-claviculaire.

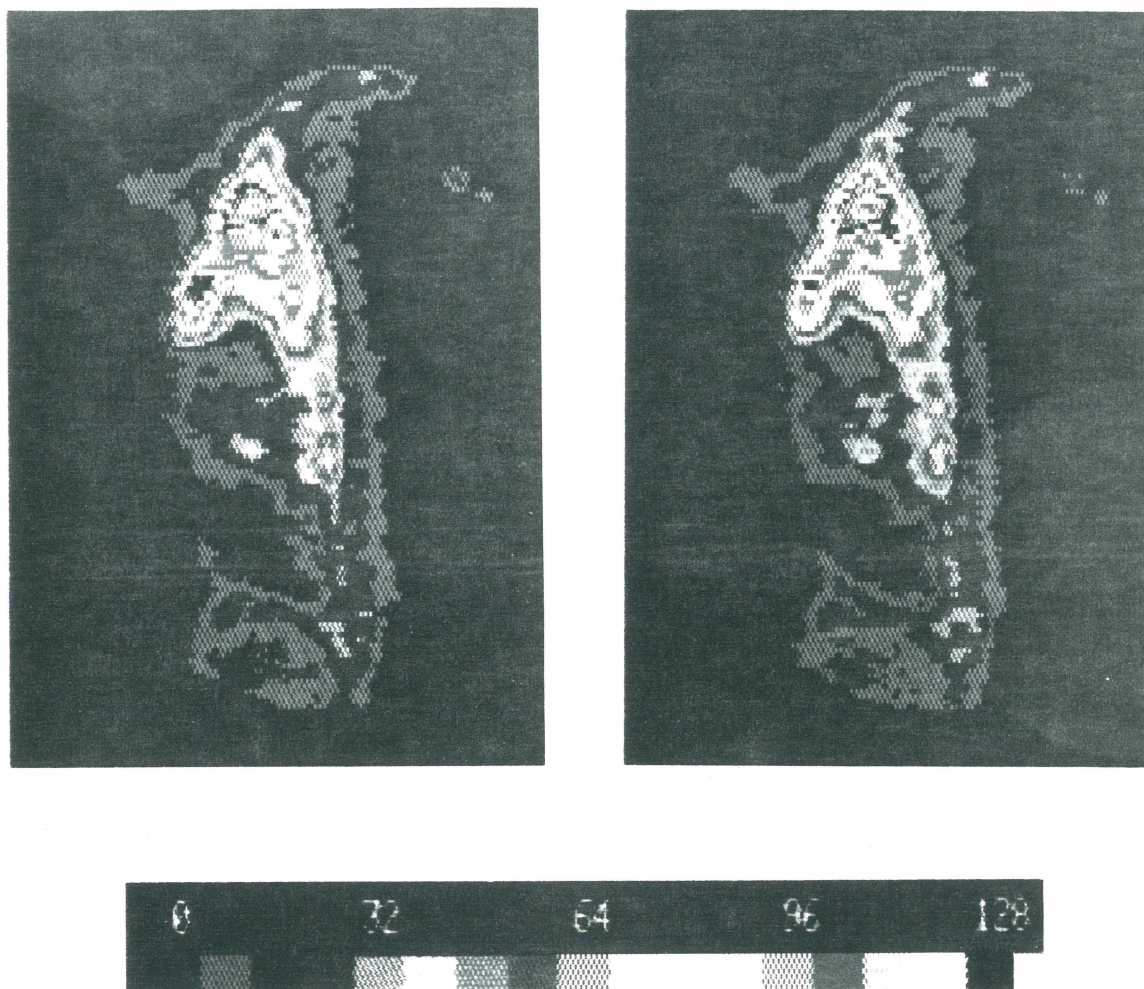


Figure 46. Biodistribution des globules rouges marqués au ^{99m}Tc .

Visualisation du pool sanguin via la distribution des globules rouges 2.5 (gauche) et 5 minutes (droite) post-injection. Les organes très vascularisés sont facilement identifiables: le coeur, le foie et la rate. Les reins sont aussi visibles. Une zone particulièrement active correspondant à la situation anatomique du pancréas et/ou de la vésicule biliaire est observable à l'extrémité inférieure postérieure du foie.

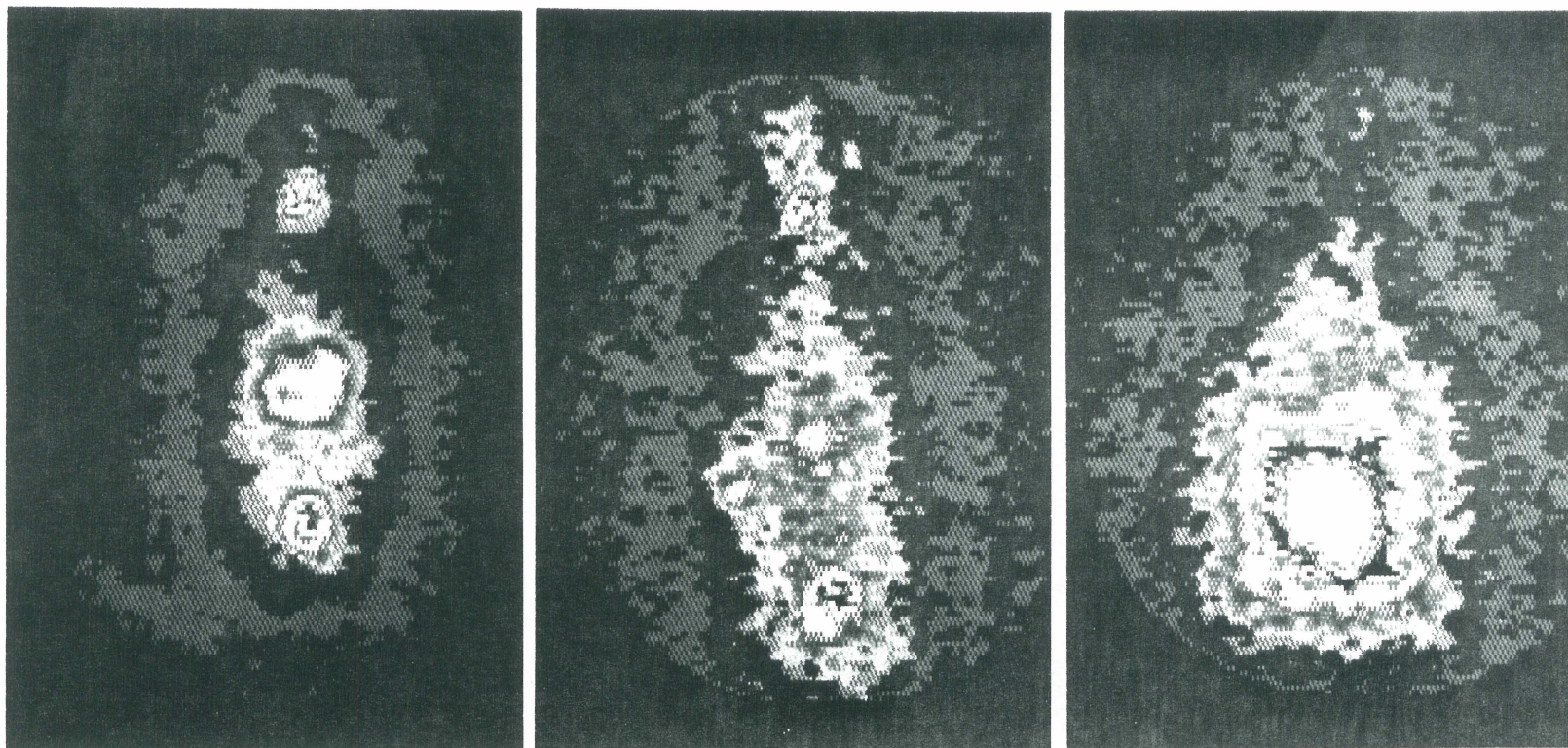


Figure 47. Biodistribution du Na^{131}I , de la ^{131}I -Tyr, de la ^{131}I -Phe et de leurs sous-produits après 6 heures post-injection.

Le ^{131}I (gauche) est rapidement mobilisé par la thyroïde. Des sites de dépôt moins importants sont notés dans la région hépatique ainsi que dans la vessie. Une intense activité de désiodation de la ^{131}I -Tyr (centre) se traduit par une importante accumulation thyroïdienne de ^{131}I . On note de plus la présence de radioactivité dans la vessie. Aucune mobilisation thyroïdienne significative de ^{131}I n'est cependant notée suite à l'administration de ^{131}I -Phe (droite). Une intense activité est notée dans la vessie dès les premières heures suivant l'injection.

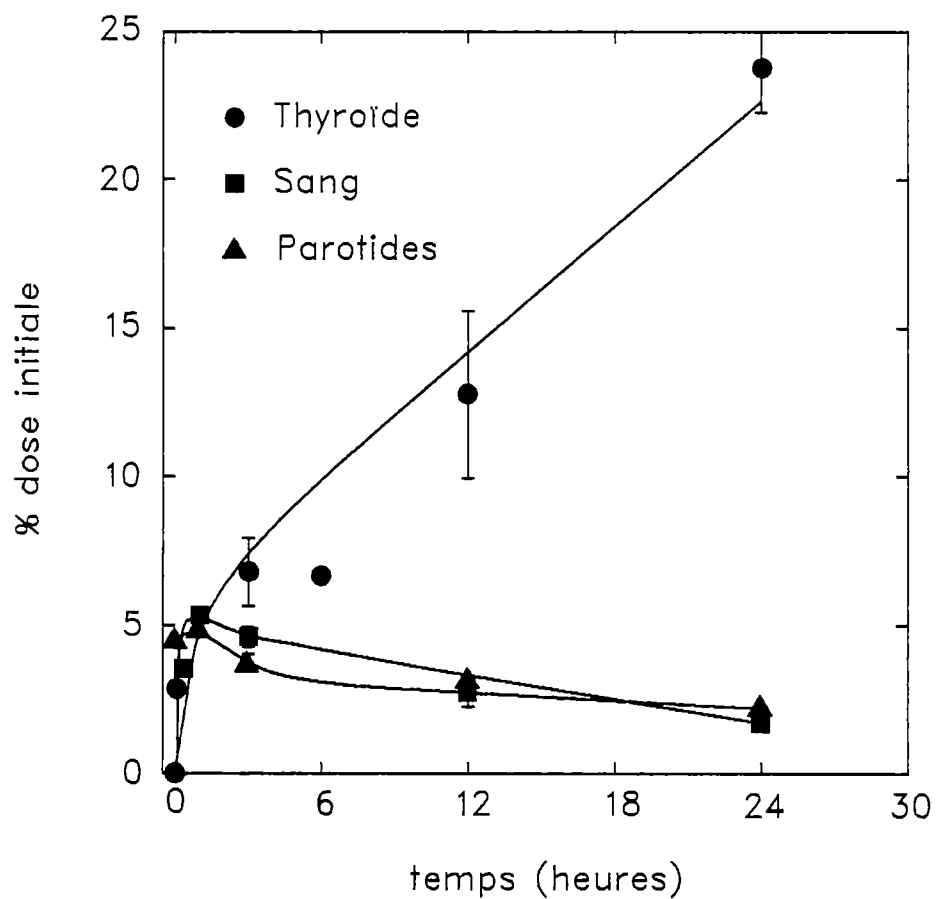


Figure 48 Biodistribution du ^{131}I après administration i.v. de Na^{131}I .

Le ^{131}I est rapidement mobilisé par la thyroïde et ce, 1 heure après son administration. Après 24 heures, près de 25% de la dose initiale est localisée dans la thyroïde alors que le taux plasmatique est dix fois moindre (2.5%). Durant les 24 heures de l'expérience, les parotides contiennent approximativement la même quantité de ^{131}I que le compartiment sanguin.

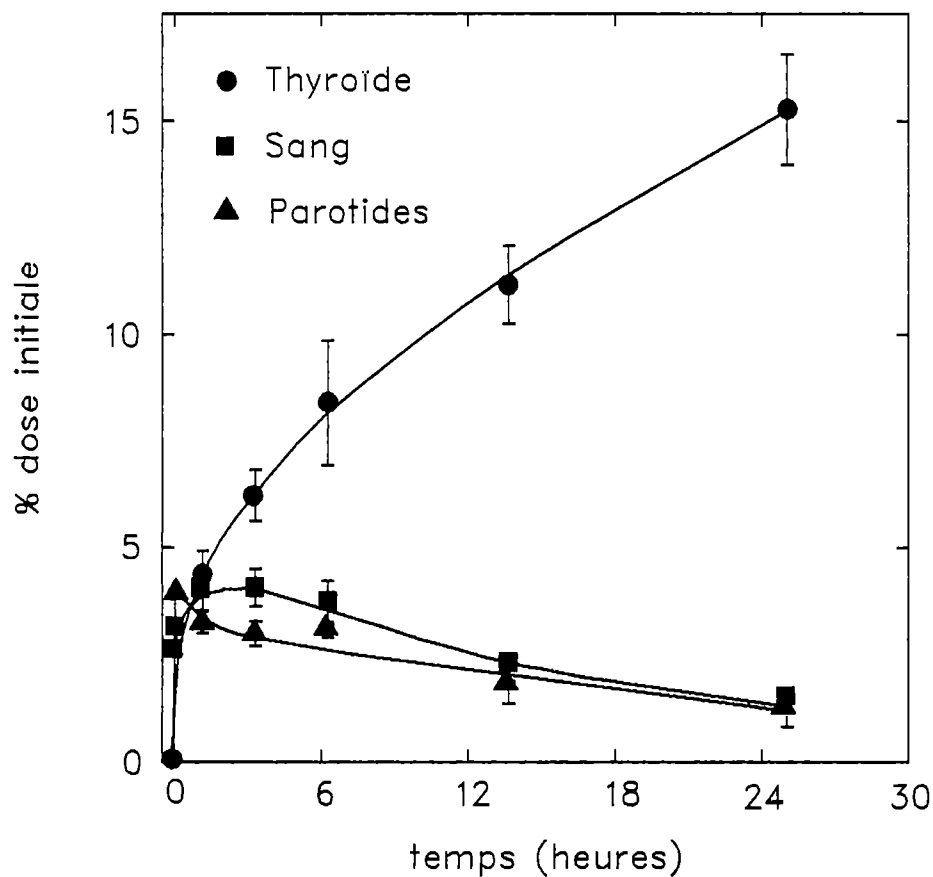


Figure 49 Biodistribution de la ^{131}I -Tyr et du ^{131}I après administration i.v.

La ^{131}I -Tyr est rapidement soumise à l'action des désiodases. Le ^{131}I est rapidement mobilisé par la thyroïde et ce, 1 heure après son administration. Après 24 heures, près de 15% de la dose initiale est localisée dans la thyroïde alors que le taux plasmatique est beaucoup moindre (2.5%). Durant les 24 heures de l'expérience, les parotides contiennent approximativement la même quantité de ^{131}I que le compartiment sanguin.

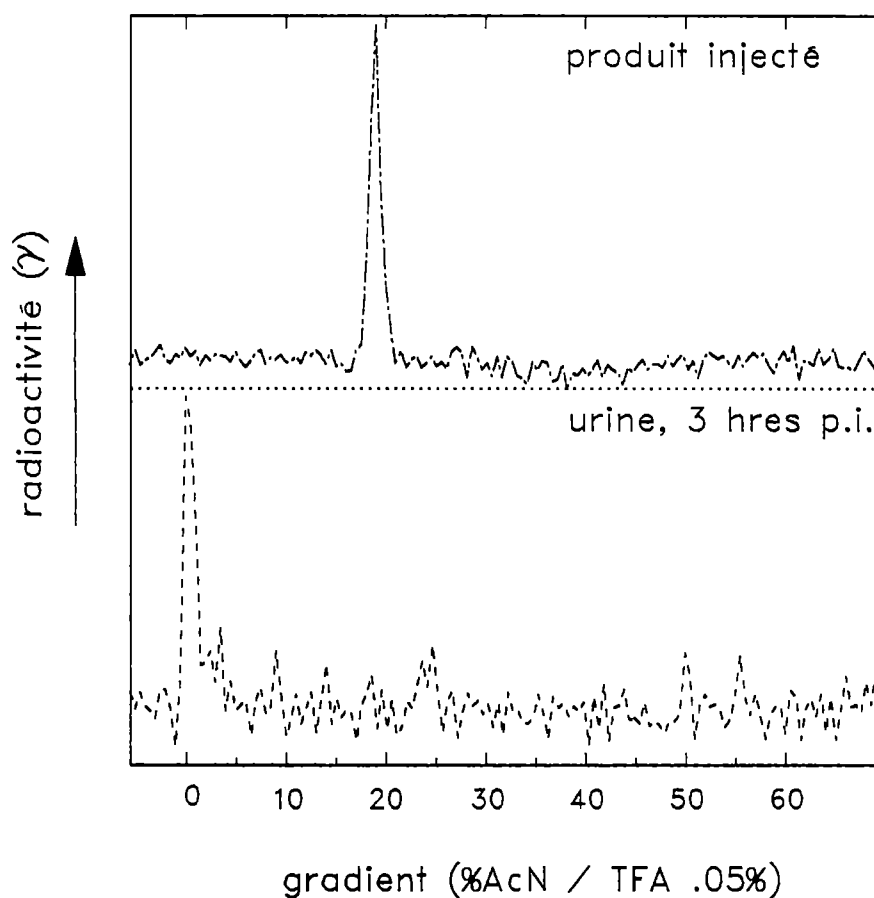


Figure 50 Analyse par HPLC du contenu radioactif urinaire suite à l'administration i.v. de ^{131}I -Tyr.

Profil d'élution en HPLC où le niveau de radioactivité (γ) est présenté en ordonnée et le gradient d'acétonitrile (%) indiqué en abscisse. L'urine récoltée après 3 heures p.i. (bas) ne contient que du ^{131}I . On ne dénote pas de présence significative du produit injecté (^{131}I -Tyr, haut).

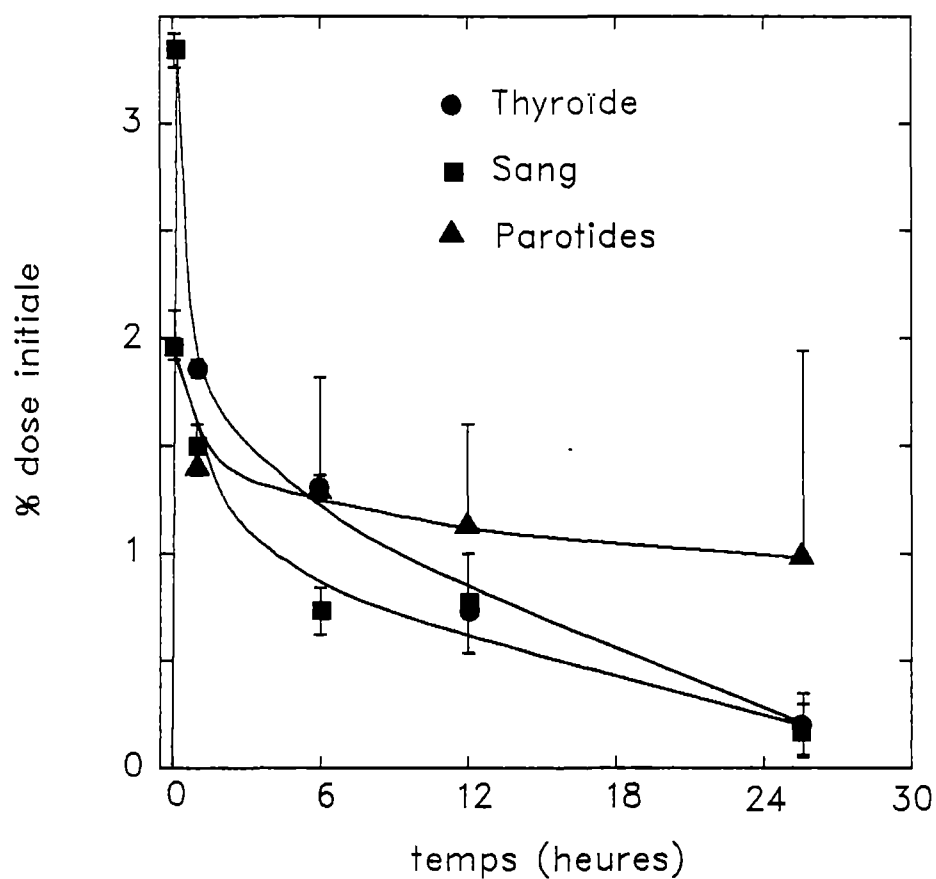


Figure 51 Biodistribution de la ^{131}I -Phe après administration i.v.

La ^{131}I -Phe n'est pas soumise à l'action des désiodases. Le niveau sanguin de radioactivité atteint un maximum de 3% dès l'administration du composé. Il retombe rapidement à une valeur équivalente aux contenus parotidien et sanguin. Les 3 contenus sont équivalents de 1 hre à 24 hres p.i.

suivant l'injection. L'analyse de l'urine démontre qu'une bonne quantité de ^{131}I -Phe semble avoir été excrété tel quel (fig.52). On note l'apparition de métabolites plus hydrophiles que la ^{131}I -Phe. En résumé, la ^{131}I -Tyr est rapidement désiodée alors que la ^{131}I -Phe est inerte face aux désiodases. La cinétique de mobilisation thyroïdienne du ^{131}I suite à l'administration de ^{131}I -Tyr est pratiquement identique à celle d'une injection de Na^{131}I (fig.53). La courbe démontrant la mobilisation thyroïdienne du ^{131}I -Phe est identique à sa courbe de clairance plasmatique (fig.51 et 53).

Biodistribution des radioligand marqués au ^{131}I .

La spécificité de liaison des radioligands a été préalablement évaluée in vitro sur des préparations membranaires appropriées. Tel qu'observé à la figure 54, le ^{131}I -Ang n'est déplacé que par le D-Phe-Ang sur des membranes de cortex surrénalien bovin. La ^{131}I -BK n'est déplaçable que par la BK sur des membranes d'iléon de cobaye. Le déplacement du ^{131}I -DPDP sur des membranes de cerveaux de rats et celui du ^{131}I -ICI sur des membranes de cerveaux de cobayes n'ont été provoqués que par le I-DPDP et le Cl-ICI respectivement. Pour chaque radioligand nous présentons des images représentatives prises en absence ou en présence de compétiteur non-radioactif. Ces images nous ont servis à calculer le contenu, relatif à la dose initiale administrée, de divers organes et tissus: thyroïde, glandes salivaires, poumons, sang, foie, reins, et vésicule biliaire. A partir de ces valeurs nous pouvons mesurer un éventuel déplacement du radioligand par un compétiteur non-radioactif. Par exemple, si les comptes moyens initiaux d'un organe des animaux exempts de compétiteur se chiffrent à 10% des comptes totaux administrés et qu'avec un compétiteur ces comptes initiaux ne représentent plus que 6% des comptes totaux administrés, nous

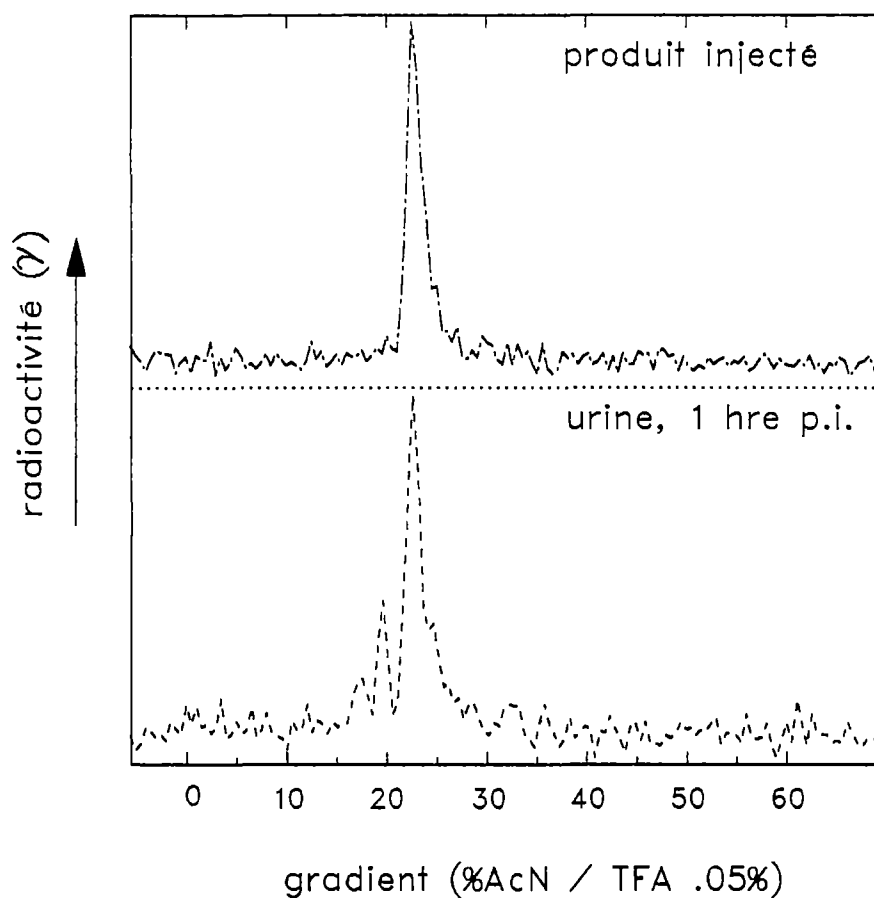


Figure 52 Analyse par HPLC du contenu radioactif urinaire suite à l'administration i.v. de ^{131}I -Phe.

Profil d'élution en HPLC où le niveau de radioactivité (γ) est présenté en ordonnée et le gradient d'acétonitrile (%) indiqué en abscisse. L'urine récoltée après 1 heure p.i. (bas) semble contenir du ^{131}I -Phe non métabolisé. On dénote aussi la présence significative de métabolites plus hydrophiles que le composé de départ (^{131}I -Phe, haut).

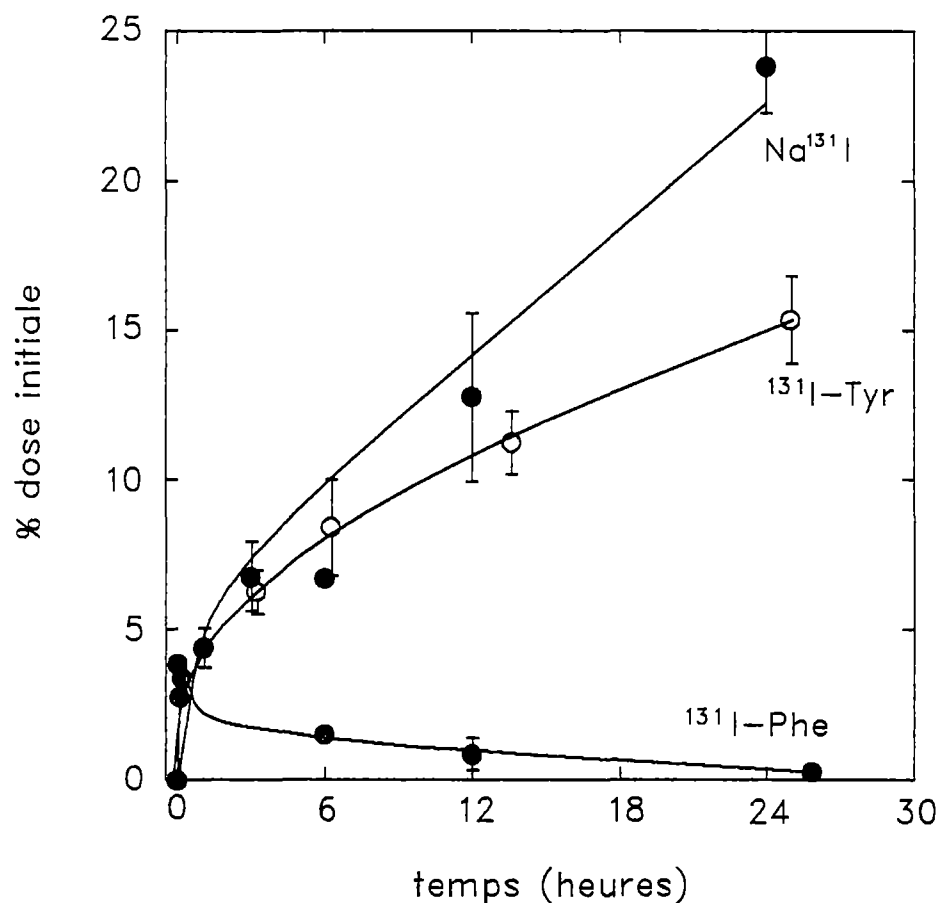


Figure 53 Comparaison des niveaux thyroïdiens de ^{131}I après administration i.v. de Na^{131}I , de $^{131}\text{I-Tyr}$ ou de $^{131}\text{I-Phe}$.

Les niveaux thyroïdiens de ^{131}I obtenus suite à l'administration de Na^{131}I et de $^{131}\text{I-Tyr}$ sont comparables. Ceci prouve que la $^{131}\text{I-Tyr}$ est rapidement désiodée. On ne note pas d'accumulation thyroïdienne suite à l'administration de $^{131}\text{I-Phe}$, le taux enregistré est équivalent au taux plasmatique. La $^{131}\text{I-Phe}$ est métaboliquement inerte face aux désiodases.

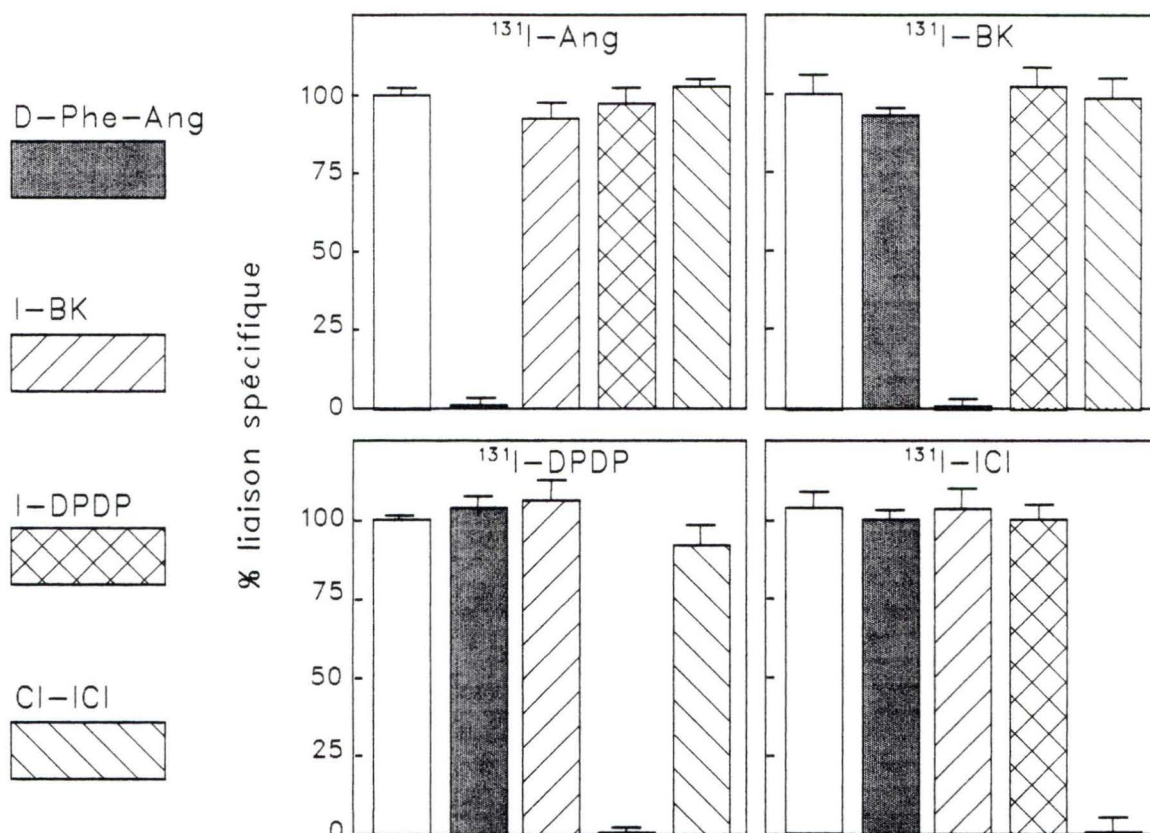


Figure 54 Vérification de la spécificité de la liaison des radioligands marqués au ^{131}I via la réaction de Gattermann/Sandmeyer.

Chaque radioligand ($\approx 10^5$ CPM) a été incubé seul ou en présence des composés non-radioactifs présentés à la gauche des graphiques. Les bâtonnets représentent le % de la liaison spécifique moyen issu d'une dizaine de lectures. Le ^{131}I -Ang n'est déplacé que par le D-Phe-Ang sur des membranes de cortex surrénalien bovin. La ^{131}I -BK n'est déplaçable que par la BK sur des membranes d'iléon de cobaye. Le déplacement du ^{131}I -DPDP sur des membranes de cerveaux de rats et celui du ^{131}I -ICI sur des membranes de cerveaux de cobayes n'ont été provoqués que par le I-DPDP et le Cl-ICI respectivement.

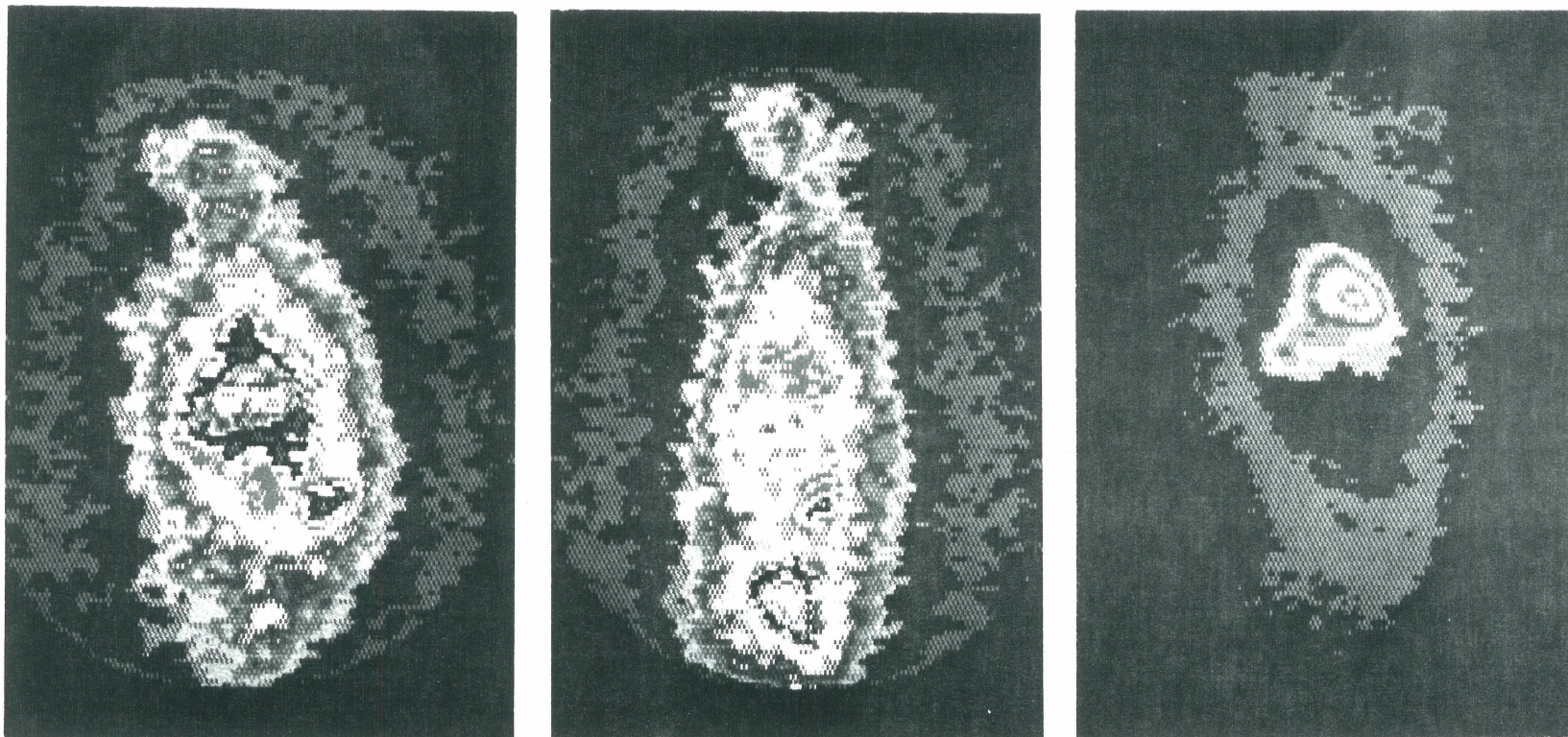


Figure 55. Biodistribution du ^{131}I -Ang avec ou sans pré-traitement au L-158,809

Images prises après administration i.v. de ^{131}I -Ang en absence de L-158,809 (gauche: 5 min. p.i., centre: 1 hre p.i.) et en présence de L-158,809 (droite: 5 min p.i.). Sans compétiteur, le peptide s'est rapidement distribué dans le pool sanguin. A 5 minutes p.i., le foie est nettement marqué et les reins sont nettement visibles. A 1 heure p.i., les reins sont encore visibles alors qu'une bonne partie de l'activité totale se retrouve dans la vessie. Si on pré-traite l'animal avec 1 mg de L-158,809, la radioactivité totale n'est localisée que dans la région hépatique et ce, dans une zone où se situe la vésicule biliaire.

pouvons affirmer que le compétiteur a déplacé 40% des comptes initiaux se retrouvant dans l'organe étudié. Ainsi 40% des comptes de l'organe caractérise une présence (liaison) spécifique du traceur. Nous présentons donc des mesures de liaison spécifique à des organes cibles. Des courbes de clairance constituées par mesure de l'activité moyenne (n=3) des principaux organes impliqués dans la biotransformation et l'excrétion des composés bioactifs (foie, intestin et vessie) complète l'information.

Le ^{131}I -Ang fut administré avec ou sans pré-traitement de l'animal à l'aide de L-158,809 (1 mg). Sans compétiteur, le peptide s'est rapidement distribué dans le pool sanguin (fig.55). A 5 minutes p.i. le foie est nettement marqué et les reins sont aussi bien visibles. A 1 heure p.i., le reins sont encore visibles alors qu'une bonne partie de l'activité totale se retrouve dans la vessie. Si on pré-traite l'animal avec 1 mg de L-158,809, la radioactivité est nettement localisée dans la région hépatique et ce, dans une zone où se situe la vésicule biliaire. Les courbes de clairance, présentées à la figure 56, démontrent une accumulation rapide de radioactivité au foie (7% de la dose initiale), à l'intestin (5% de la dose initiale) et au rein (3% de la dose initiale). Les temps de demi-vie hépatique, intestinale et urinaire sont d'environ 3, 6 et 24 heures respectivement. Des mesures de liaison spécifique ont été produites à l'aide des images prises à 5 minutes et 1 heure p.i. (fig.57). A 5 minutes p.i., nous notons que le L,158-809 atténue la présence du ^{131}I - Ang au foie (25%), aux poumons (55%) et aux reins (25%). A 1 heure p.i., la seule atténuation significative engendrée par le L-158,809 est mesurée aux poumons et se chiffre à environ 50%. L'analyse par HPLC des composés excrétés dans l'urine démontre la présence d'un composé éluant au même endroit que l'Ang ($\approx 42\%$ du gradient, fig.

58). Des métabolites plus hydrophiles sont présents dans l'urine excrétée 1 heure p.i. Le contenu relatif de ces métabolites hydrophiles s'accroît en fonction du temps. La mesure du niveau de radioactivité des fèces indiqua une présence très faible de composés radioactifs. Une extraction de ceux-ci fut faite avec un rendement trop faible pour permettre une analyse en HPLC.

La ^{131}I -BK fut administrée seule ou en présence de BK (2 mg). Sans compétiteur, le peptide s'est rapidement localisé dans le pool sanguin. A 5 min. p.i. les poumons et le foie sont bien visibles (fig.59). Un peu d'activité est mesurable au niveau de l'intestin. A 1 heure p.i., l'activité dans la zone intestinale s'est accrue (fig.60). Si on traite l'animal avec 2 mg de BK, peu de différences sont notées à 5 minutes p.i. Cependant à 1 heure p.i., l'activité des zones hépatique et intestinale semblent significativement réduites. Les courbes de clairance, présentées à la figure 61, démontrent une accumulation rapide de radioactivité au foie (5.5% de la dose initiale), à l'intestin (4% de la dose initiale) et au rein (3.5% de la dose initiale). Les temps de demi-vie hépatique, intestinale et urinaire sont d'environ 18-20 heures. Des mesures de liaison spécifique aux intestins et aux reins ont été produites à l'aide des images prises à 5 minutes, 1 heure, 3 heures et 6 heures p.i. (fig. 62). La présence de BK semble avoir suscité une atténuation généralisée des comptes de l'ordre de 10%-15% et ce, chez les deux organes étudiés. L'analyse par HPLC des composés excrétés dans l'urine démontre la présence d'un composé éluant au même endroit que la ^{131}I -BK ($\approx 35\%$ du gradient, fig.63). Des métabolites plus hydrophiles et d'autres plus hydrophobes sont présents dans l'urine excrétée 1 heure p.i. Le contenu relatif des métabolites hydrophiles atteint un maximum à 6 heures p.i. La mesure du niveau

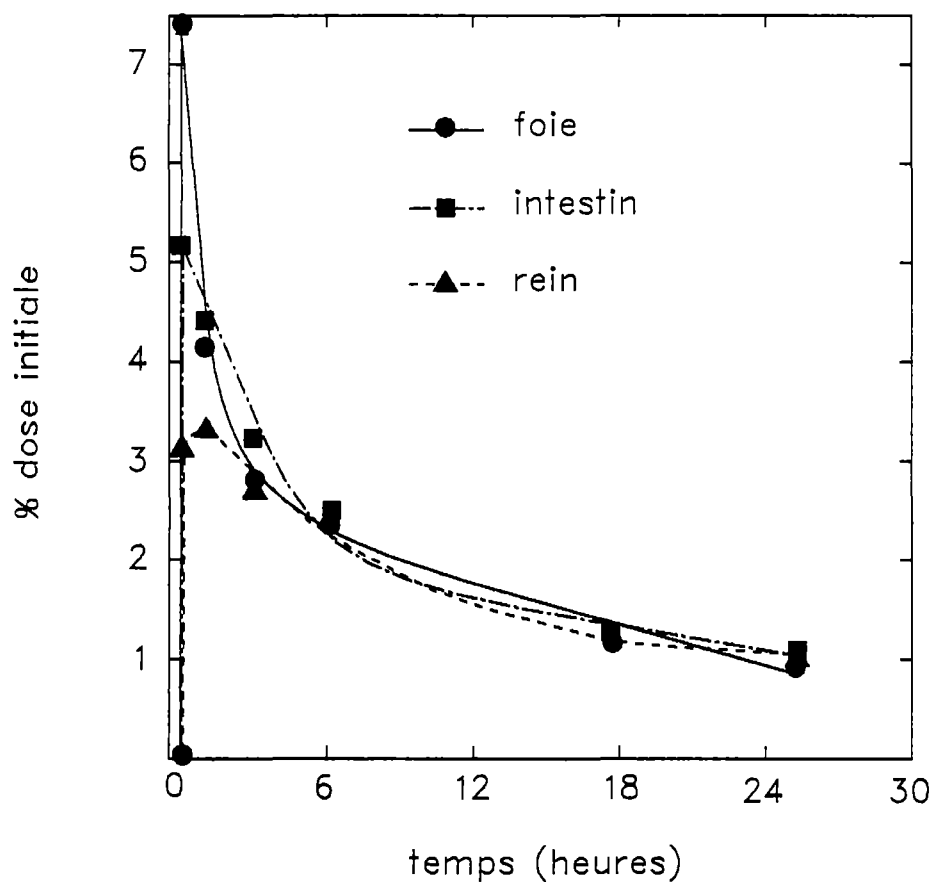


Figure 56 Biodistribution du ^{131}I -Ang ou de ses métabolites après administration i.v.

On dénote une accumulation rapide de radioactivité au foie (7% de la dose initiale), à l'intestin (5% de la dose initiale) et au rein (3% de la dose initiale). Les temps de demi-vie hépatique, intestinale et urinaire sont d'environ 3, 6 et 24 heures respectivement. Les valeurs représente la moyenne de 3 lectures effectuées indépendamment.

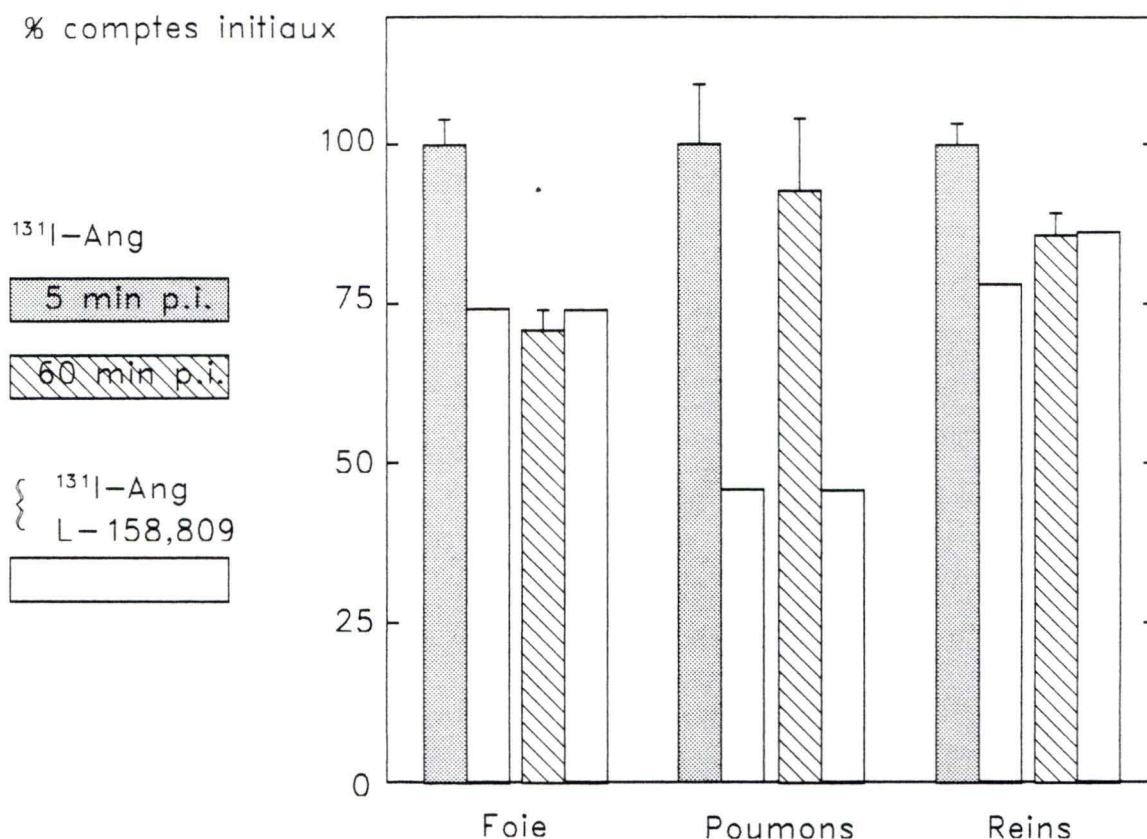


Figure 57 Effet du L-158,809 sur la présence du $^{131}\text{I}-\text{Ang}$ ou de ses métabolites au foie, aux poumons et aux reins.

Les comptes imputables à la présence du $^{131}\text{I}-\text{Ang}$ ou de ses métabolites sont représentés en ordonnée et relativisés en % des comptes initiaux moyens trouvés dans l'organe exempt de compétiteur. A 5 minutes p.i., nous notons que le L-158-809 atténue la présence du $^{131}\text{I}-\text{Ang}$ au foie (25%), aux poumons (55%) et aux reins (25%). A 60 minutes p.i., la seule atténuation significative engendrée par le L-158,809 est mesurée aux poumons et se chiffre à environ 50%. Les niveaux globaux de radioactivité au foie et aux reins ont diminué en fonction du temps. L'activité pulmonaire globale n'a pas changé significativement.

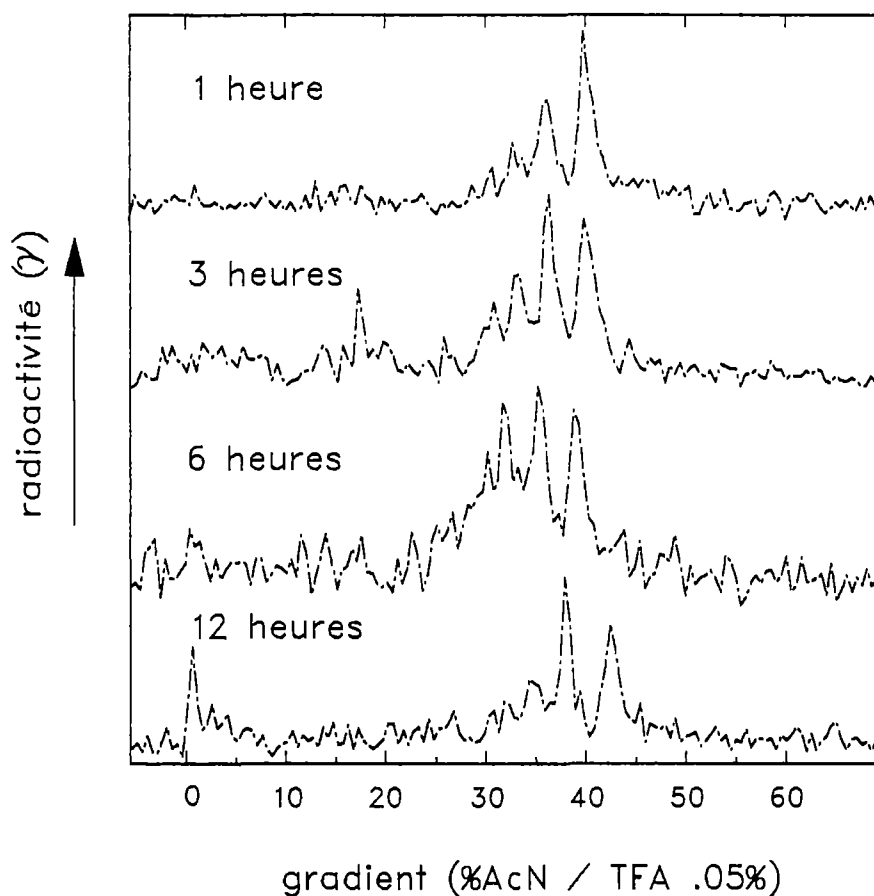


Figure 58 Analyse qualitative par HPLC du contenu radioactif urinaire suite à l'administration i.v. de ^{131}I -Ang.

Profil d'élution en HPLC où le niveau de radioactivité (γ) est présenté en ordonnée et le gradient d'acétonitrile (%) indiqué en abscisse. L'urine a été récoltée à 1, 3, 6, et 12 heures p.i. On dénote la présence d'un composé éluant au même endroit que le ^{131}I -Ang ($\approx 42\%$ du gradient, fig. 58). Des métabolites plus hydrophiles sont déjà présents dans l'urine excrétée à 1 heure p.i. Le contenu relatif de ces métabolites hydrophiles s'accroît en fonction du temps.

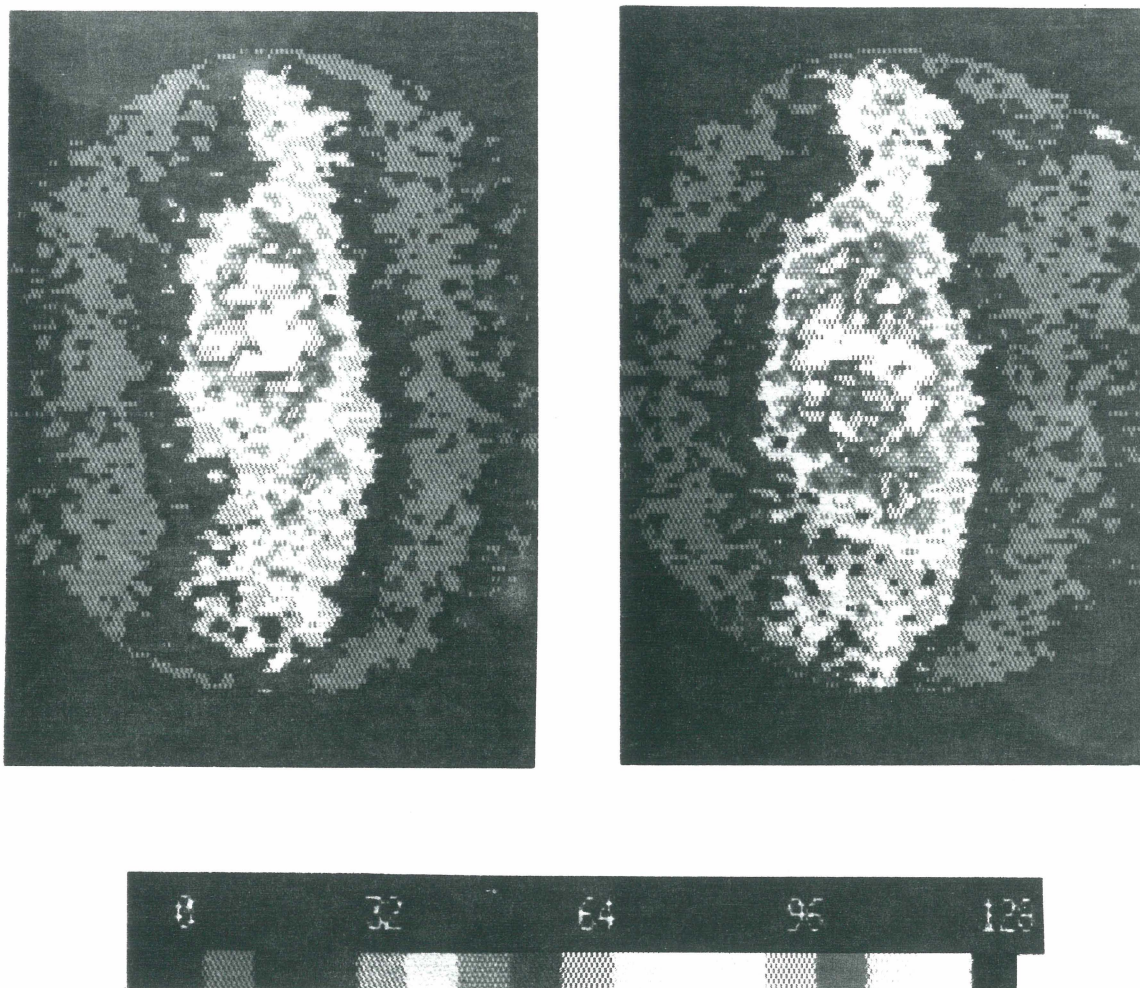


Figure 59 Biodistribution du ^{131}I -BK ou de ses métabolites 5 minutes après administration i.v.

La ^{131}I -BK fut administrée seule (gauche) ou en présence de 2 mg de BK (droite). Sans compétiteur, le peptide s'est rapidement localisé dans le pool sanguin. Les poumons et le foie sont bien visibles. Un peu d'activité est mesurable au niveau de l'intestin. Si on traite l'animal avec 2 mg de BK, on ne note pas de différence significative de la distribution.

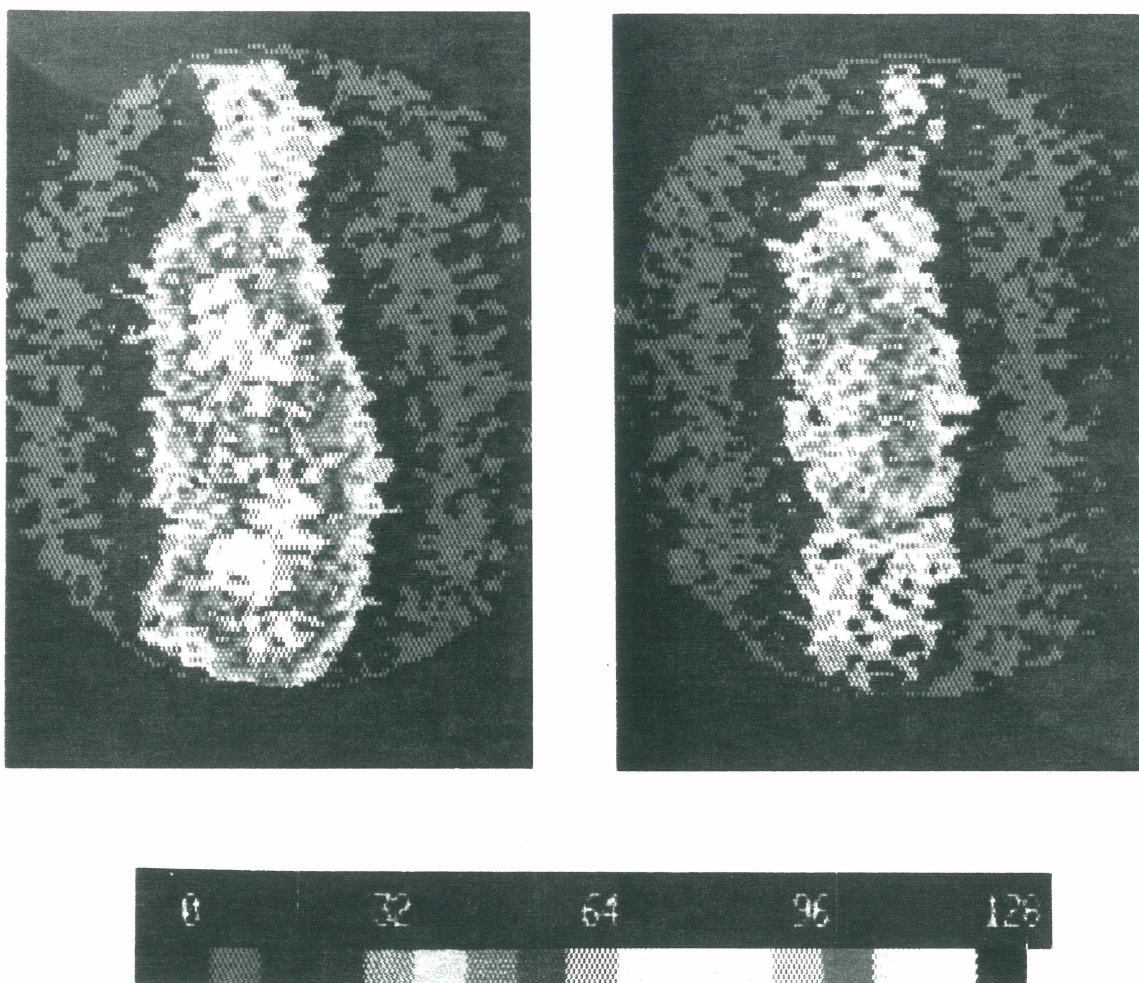


Figure 60 Biodistribution de la ^{131}I -BK ou de ses métabolites 1 heure après administration i.v.

La ^{131}I -BK fut administrée seule (gauche) ou en présence de 2 mg de BK (droite). Sans compétiteur, le peptide ou ses métabolites sont encore présents aux poumons et dans le foie. L'activité dans la zone intestinale s'est considérablement accrue. Si on traite l'animal avec 2 mg de BK, l'activité des zones hépatique et intestinale semblent significativement réduite.

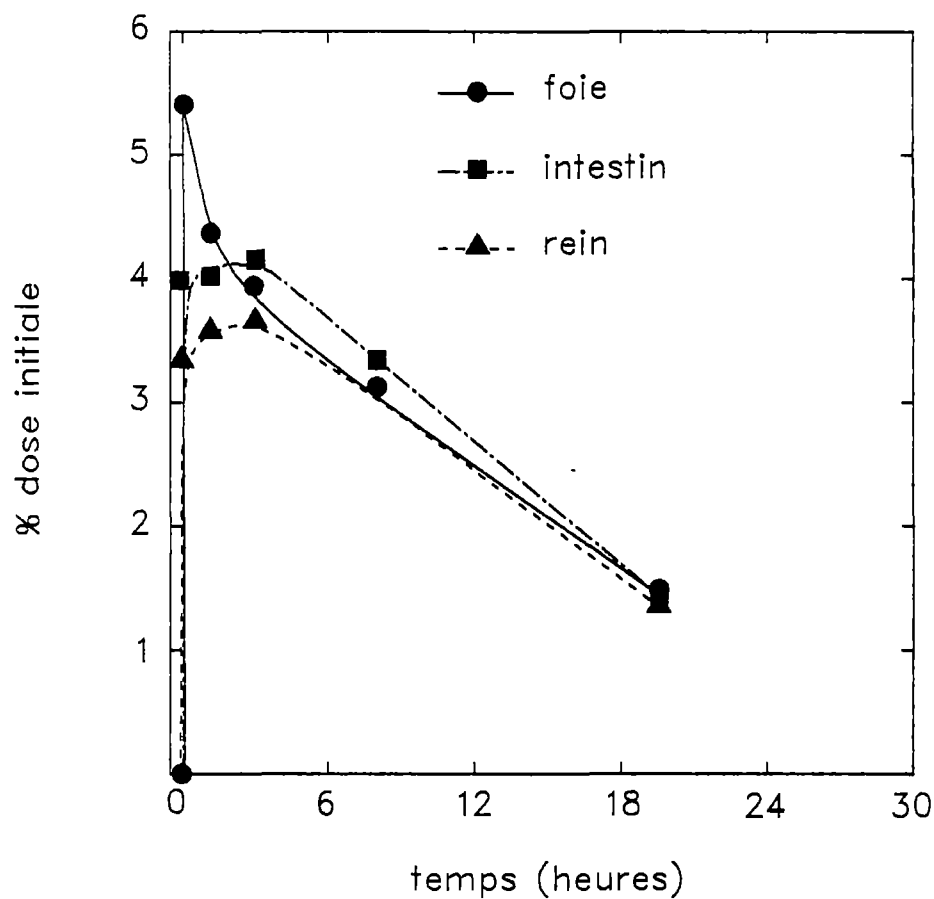


Figure 61 Biodistribution de la ^{131}I -BK ou de ses métabolites après administration i.v.

On dénote une accumulation rapide de radioactivité au foie (5.5% de la dose initiale), à l'intestin (4% de la dose initiale) et au rein (3.5% de la dose initiale). Les temps de demi-vie hépatique, intestinale et urinaire sont d'environ 18-20 heures. Les valeurs représentent la moyenne de 3 lectures effectuées indépendamment.

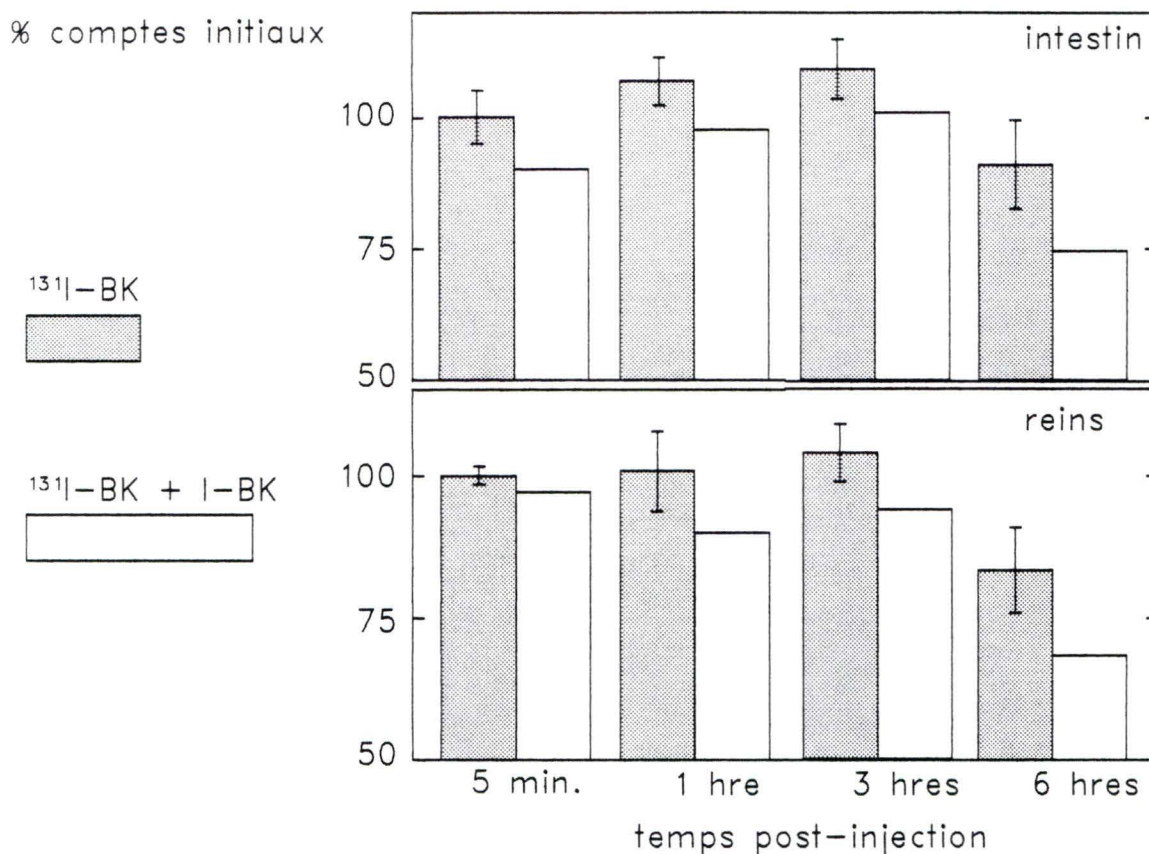


Figure 62 Effet de la BK ou de ses métabolites sur la présence de la $^{131}\text{I-BK}$ ou de ses métabolites à l'intestin et aux reins.

Les comptes imputables à la présence de la $^{131}\text{I-BK}$ ou de ses métabolites sont représentés en ordonnée et relativisés en % des comptes initiaux moyens trouvés dans l'organe exempt de compétiteur. Entre 5 minutes et 3 heures p.i., nous notons que la BK ou ses métabolites atténuent légèrement la présence de la $^{131}\text{I-BK}$ ou ses métabolites dans l'intestin et aux reins. Cette diminution se chiffre entre 10 et 15%. Après 6 heures, l'atténuation s'accroît à plus de 20%. Après 6 heures, les niveaux totaux de radioactivité des organes étudiés ont diminué d'environ 15-20%.

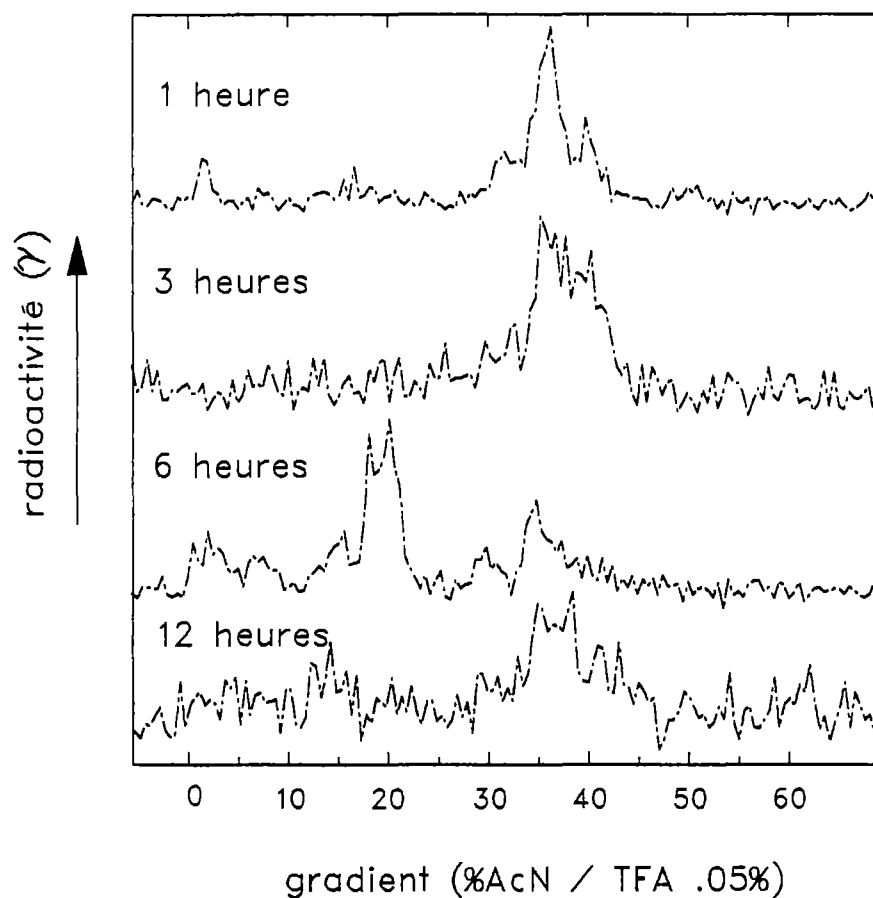


Figure 63 Analyse qualitative par HPLC du contenu radioactif urinaire suite à l'administration i.v. de ¹³¹I-BK.

Profil d'élution en HPLC où le niveau de radioactivité (γ) est présenté en ordonnée et le gradient d'acétonitrile (%) indiqué en abscisse. L'urine a été récoltée à 1, 3, 6, et 12 heures p.i. A 1 et 3 heures p.i., on dénote la présence d'un composé éluant au même endroit que le ¹³¹I-BK (≈38% du gradient). Des métabolites plus hydrophiles sont présents en bonne concentration à 6 heures p.i.

de radioactivité des fèces indiqua une présence trop faible de composés radioactifs compromettant une éventuelle analyse en HPLC de ceux-ci.

Le ^{131}I -DPDP fut administré seul ou en présence de naloxone (2 mg). Sans compétiteur, le peptide s'est rapidement localisé dans la région hépatique, aux reins, à la vessie (ou à une structure connexe comme la prostate) et un peu aux intestins (fig.64). A 1 heure p.i., l'activité est concentrée aux intestins et dans une zone très localisée du foie correspondant à la situation anatomique de la rate (fig.65). Si on traite l'animal avec 2 mg de naloxone, l'activité hépatique enregistrée à 5 min p.i. semble réduite à une zone correspondant à la situation anatomique de la vésicule biliaire. Pour le même laps de temps, l'activité localisée aux reins et à la vessie est pratiquement abolie par le naloxone. A 1 heure p.i., l'activité des intestins est aussi fortement réduite alors que celle notée dans la région hépatique (près de la rate) est totalement disparue. Les courbes de clairance, présentées à la figure 66, démontrent une accumulation rapide de radioactivité au foie (7.5% de la dose initiale), à l'intestin (14% de la dose initiale). L'accumulation urinaire est très faible et n'est pas représentée dans cette figure. Le temps de demi-vie hépatique est d'environ 4-6 heures. Notons que les courbes de clairance intestinale et hépatique sont asymptotiques et plafonnent respectivement à des valeurs à 11 et 2%. Des mesures de liaison spécifique au foie et à la vésicule biliaire ont été produites à l'aide des images prises à 1 heure et 24 heures p.i. (fig. 67). A 1 heure p.i. le naloxone semble avoir suscité une atténuation des comptes de l'ordre de 30% au foie et de près de 60% à la vésicule biliaire. Bien que l'activité totale des deux organes soit réduite de moitié après 24 heures, le naloxone susciterait encore un déplacement de près de

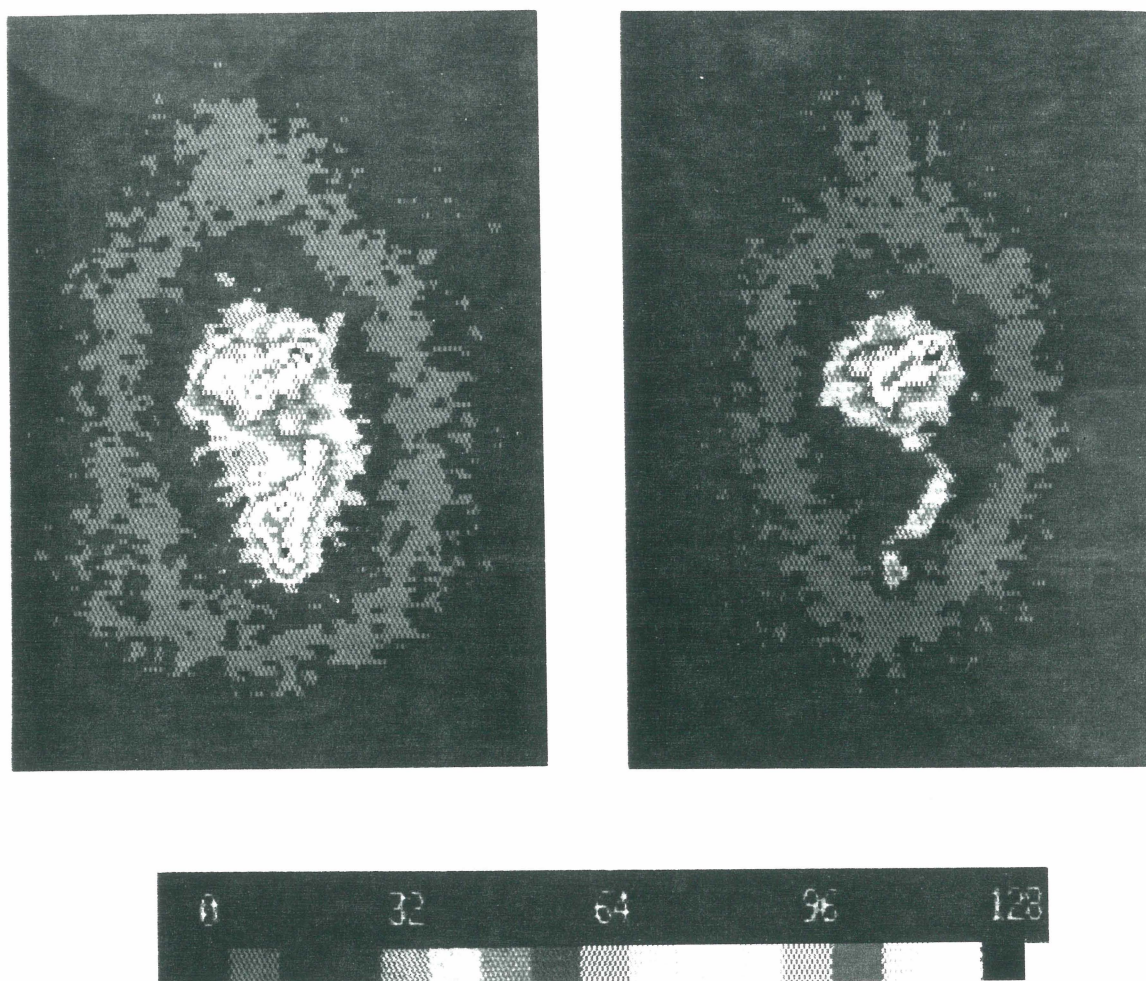


Figure 64 Biodistribution du ^{131}I -DPDP ou de ses métabolites 5 minutes après administration i.v.

Le ^{131}I -DPDP fut administré seul (gauche) ou en présence de 2 mg de naloxone (droite). Sans compétiteur, le peptide s'est rapidement localisé dans la région hépatique, aux reins, à la vessie (ou à une structure connexe comme la prostate) et un peu aux intestins. Si on traite l'animal avec 2 mg de naloxone, l'activité hépatique enregistrée semble réduite à une zone correspondant à la situation anatomique de la vésicule biliaire.

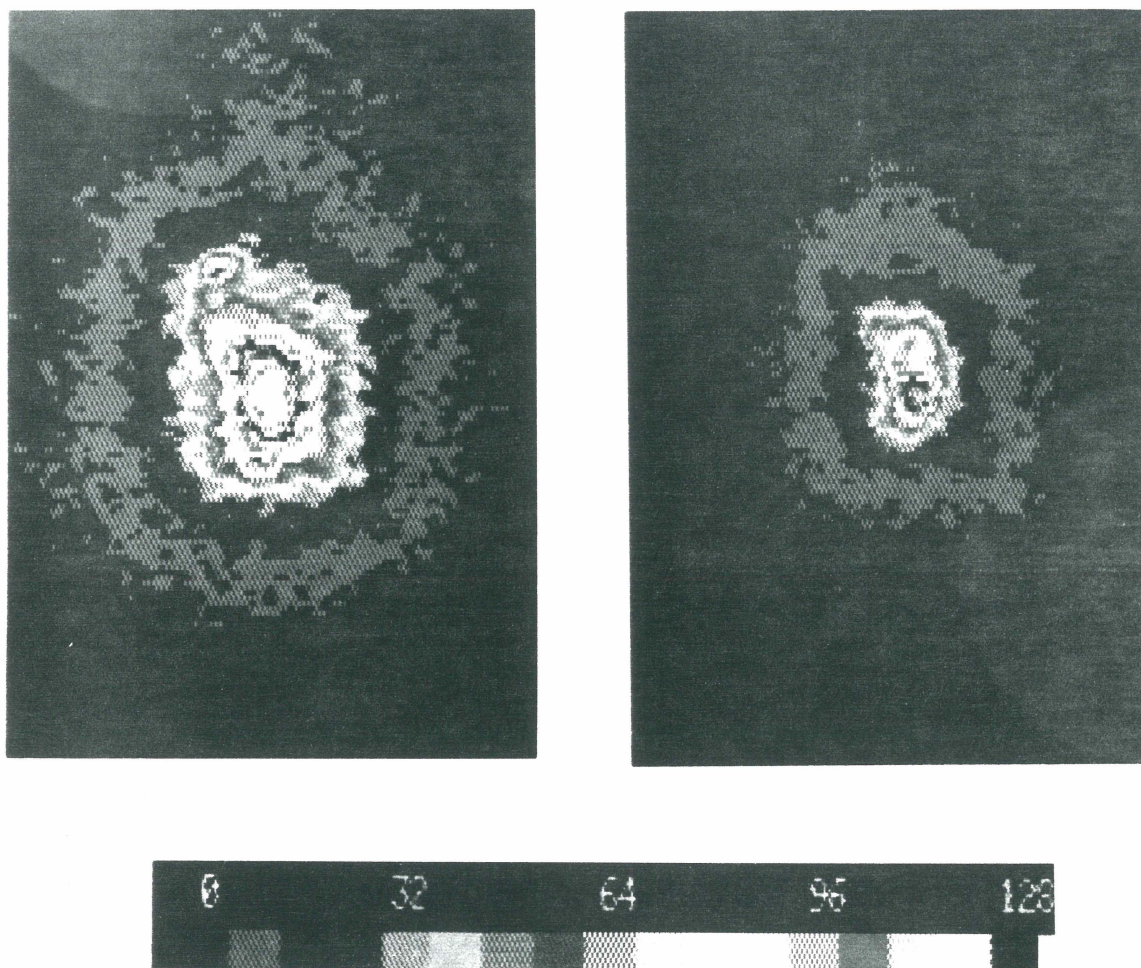


Figure 65 Biodistribution du ^{131}I -DPDP ou de ses métabolites 1 heure après administration i.v.

Le ^{131}I -DPDP fut administré seul (gauche) ou en présence de 2 mg de naloxone (droite). A 1 heure p.i., l'activité est concentrée aux intestins et dans une zone très localisée du foie correspondant à la situation anatomique de la rate. La présence de naloxone semble avoir réduit significativement l'activité des intestins alors que celle notée dans la région hépatique (près de la rate) est totalement disparue.

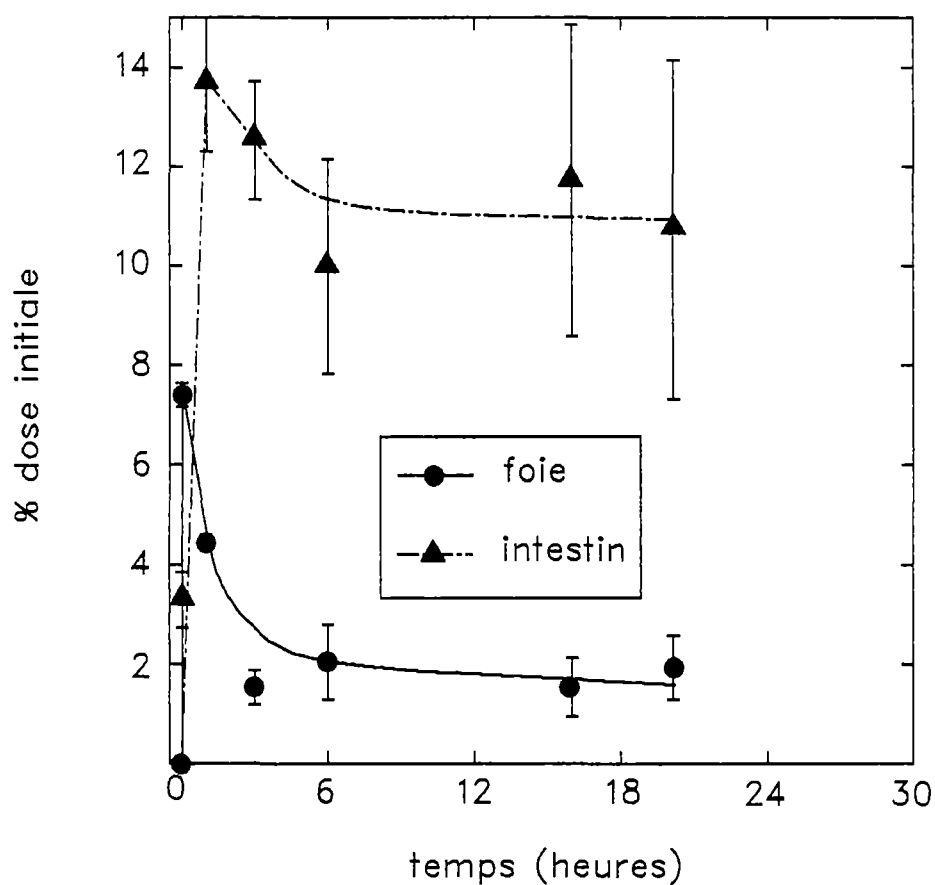


Figure 66 Biodistribution du ^{131}I -DPDP ou de ses métabolites après administration i.v.

On dénote une accumulation rapide de radioactivité au foie (7.5% de la dose initiale), à l'intestin (14% de la dose initiale). L'accumulation urinaire est très faible et n'est pas représentée dans cette figure. Le temps de demi-vie hépatique est d'environ 4-6 heures. Notons que les courbes de clairance intestinale et hépatique sont asymptotiques et plafonnent respectivement à des valeurs à 11 et 2%. Les valeurs représente la moyenne de 3 lectures effectuées indépendamment.

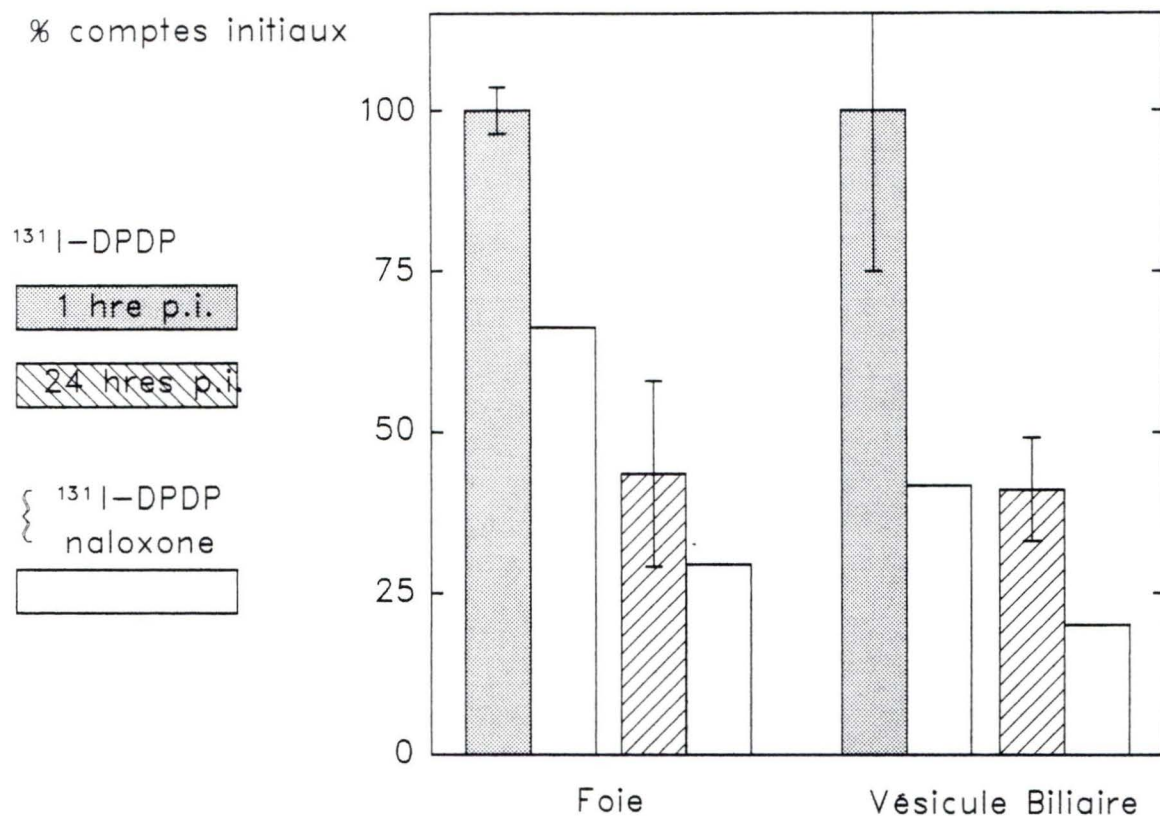


Figure 67. Effet du naloxone sur la présence du ^{131}I -DPDP ou de ses métabolites au foie et à la vésicule biliaire.

Les comptes imputables à la présence du ^{131}I -DPDP ou de ses métabolites sont représentés en ordonnée et relativisés en % des comptes initiaux moyens trouvés dans l'organe exempt de compétiteur. A 1 heure p.i. le naloxone semble avoir suscité une atténuation des comptes de l'ordre de 30% au foie et de près de 60% à la vésicule biliaire. Bien que l'activité totale des deux organes soit réduite de moitié après 24 heures, le naloxone susciterait encore un déplacement du ^{131}I -DPDP ou de ses métabolites de l'ordre de 30% au foie et de plus de 50% à la vésicule biliaire.

30% au foie et de plus de 50% à la vésicule biliaire. L'analyse par HPLC des traces de composés excrétés dans l'urine démontre la présence d'un composé éluant au même endroit que le ^{131}I -DPDP ($\approx 40\%$ du gradient, fig.68). Des métabolites plus hydrophiles sont présents dans l'urine excrétée 1 heure p.i. Le contenu relatif des métabolites hydrophiles atteint un maximum à 12 heures p.i. La mesure du niveau de radioactivité des fèces indiqua, une fois de plus, une quantité trop infime de composés radioactifs permettant une analyse en HPLC.

Le ^{131}I -ICI fut administré à l'animal en absence ou en présence de naloxone (1 mg). Sans compétiteur, le composé s'est rapidement distribué dans l'abdomen de l'animal. A 5 minutes p.i. on le localise au foie, aux intestins et aux reins (fig.69). A 24 heures p.i., l'activité s'est accrue au niveaux de certaines structures de l'intestin mais s'est atténuée au niveau hépatique (fig.70). La thyroïde est marquée mais son activité totale est inférieure à 2%. Si on traite l'animal avec 1 mg de naloxone, la radioactivité perceptible 5 minutes p.i. est sensiblement la même au niveau du foie. Cependant la partie antérieure de l'intestin est moins active et les reins ne sont plus discernables. Après 24 heures, le naloxone semble avoir réduit l'activité intestinale considérablement. Les courbes de clairance, présentées à la figure 71, démontrent une accumulation rapide de radioactivité au foie (9% de la dose initiale) et au rein (5% de la dose initiale) mais, beaucoup plus lente à l'intestin (5.5% de la dose initiale). Les temps de demi-vie hépatique et intestinale sont d'environ 5 et 18 heures respectivement. Des mesures de liaison spécifique au foie et à l'intestin ont été produites à l'aide des images prises à 5 minutes, 5 heures et 24 heures p.i. (fig.72). L'atténuation de l'activité au foie par le naloxone fut maximale à 5 min p.i. atteignant

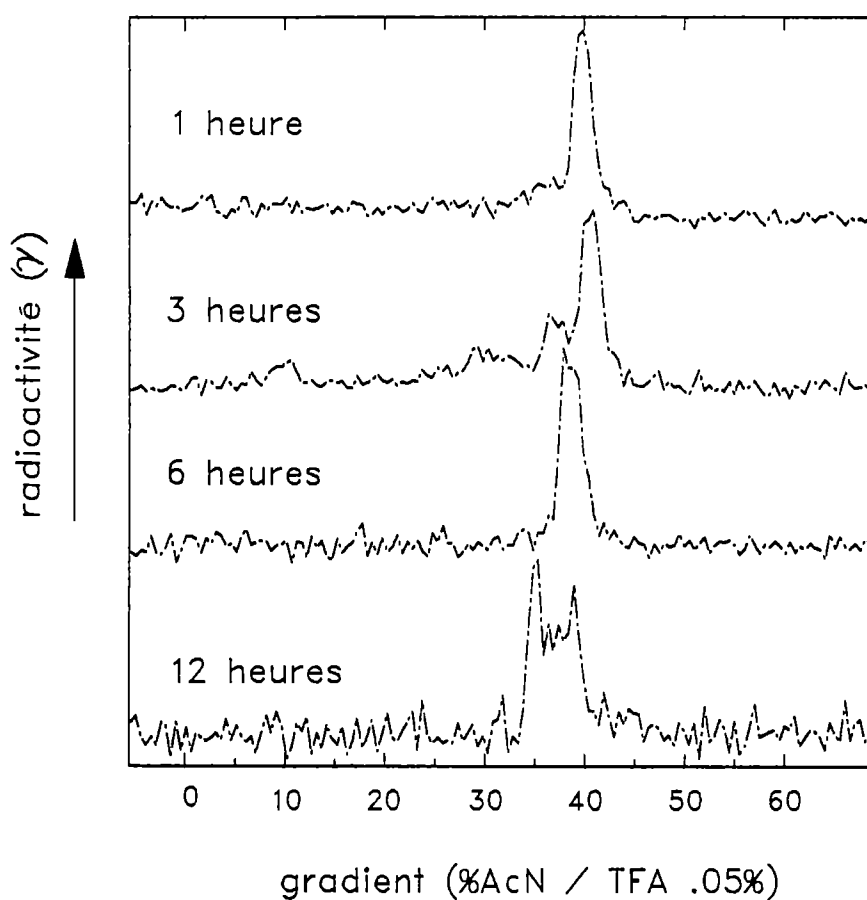


Figure 68. Analyse qualitative par HPLC du contenu radioactif urinaire suite à l'administration i.v. du ^{131}I -DPDP.

Profil d'élution en HPLC où le niveau de radioactivité (γ) est présenté en ordonnée et le gradient d'acétonitrile (%) indiqué en abscisse. L'urine a été récoltée à 1, 3, 6, et 12 heures p.i. A 1 et 3 heures p.i., on dénote la présence d'un composé éluant au même endroit que le ^{131}I -DPDP ($\approx 40\%$ du gradient). Des métabolites plus hydrophiles sont présents en bonne concentration dès 3 heures p.i.

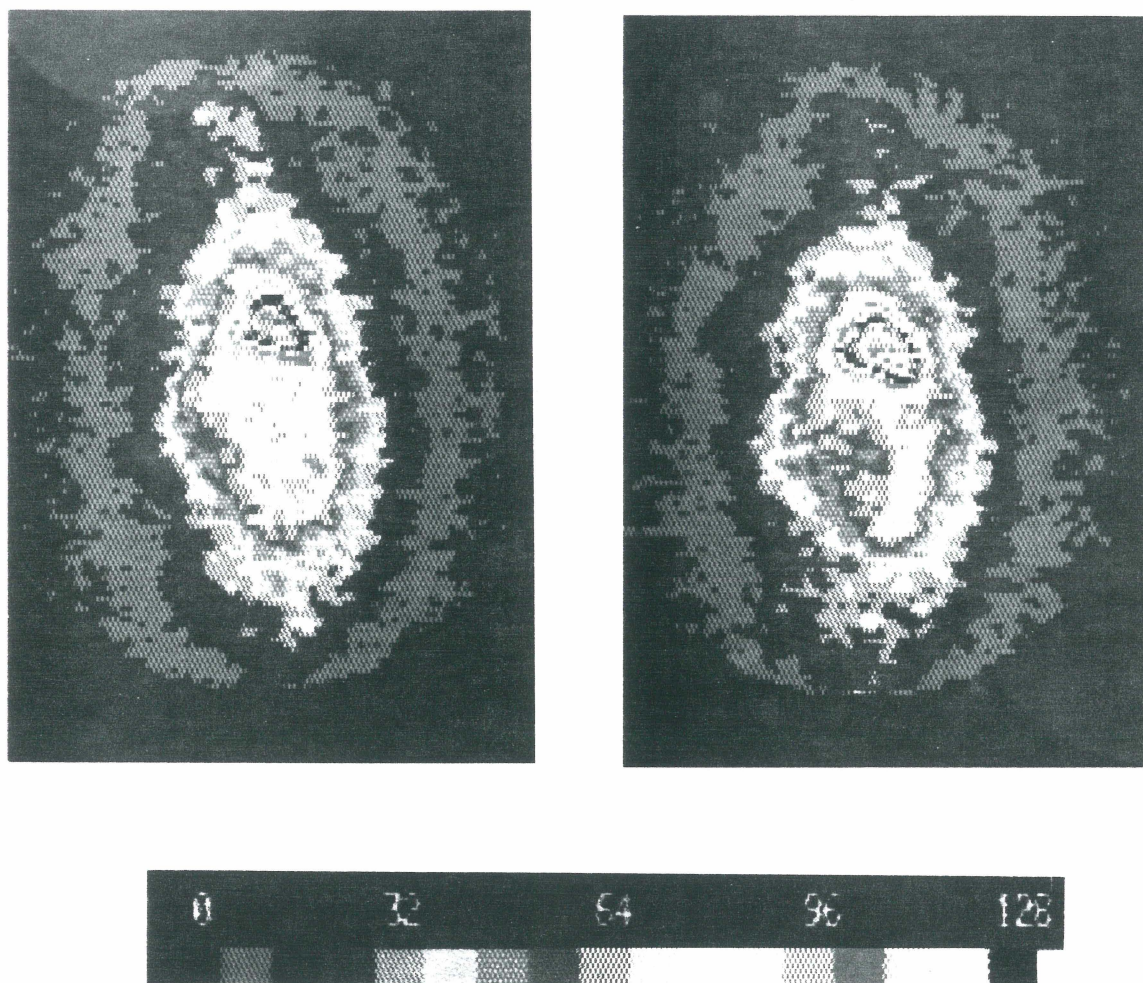


Figure 69. Biodistribution du ^{131}I -ICI ou de ses métabolites 5 minutes après administration i.v.

Le ^{131}I -ICI fut administré seul (gauche) ou en présence de 2 mg de naloxone (droite). Sans compétiteur, le composé s'est rapidement distribué dans l'abdomen de l'animal. A 5 minutes p.i. on le localise au foie, aux intestins et aux reins. Si on traite l'animal avec 1 mg de naloxone, la radioactivité perceptible est sensiblement la même au niveau du foie. Cependant la partie antérieure de l'intestin est moins active et les reins ne sont plus discernables.

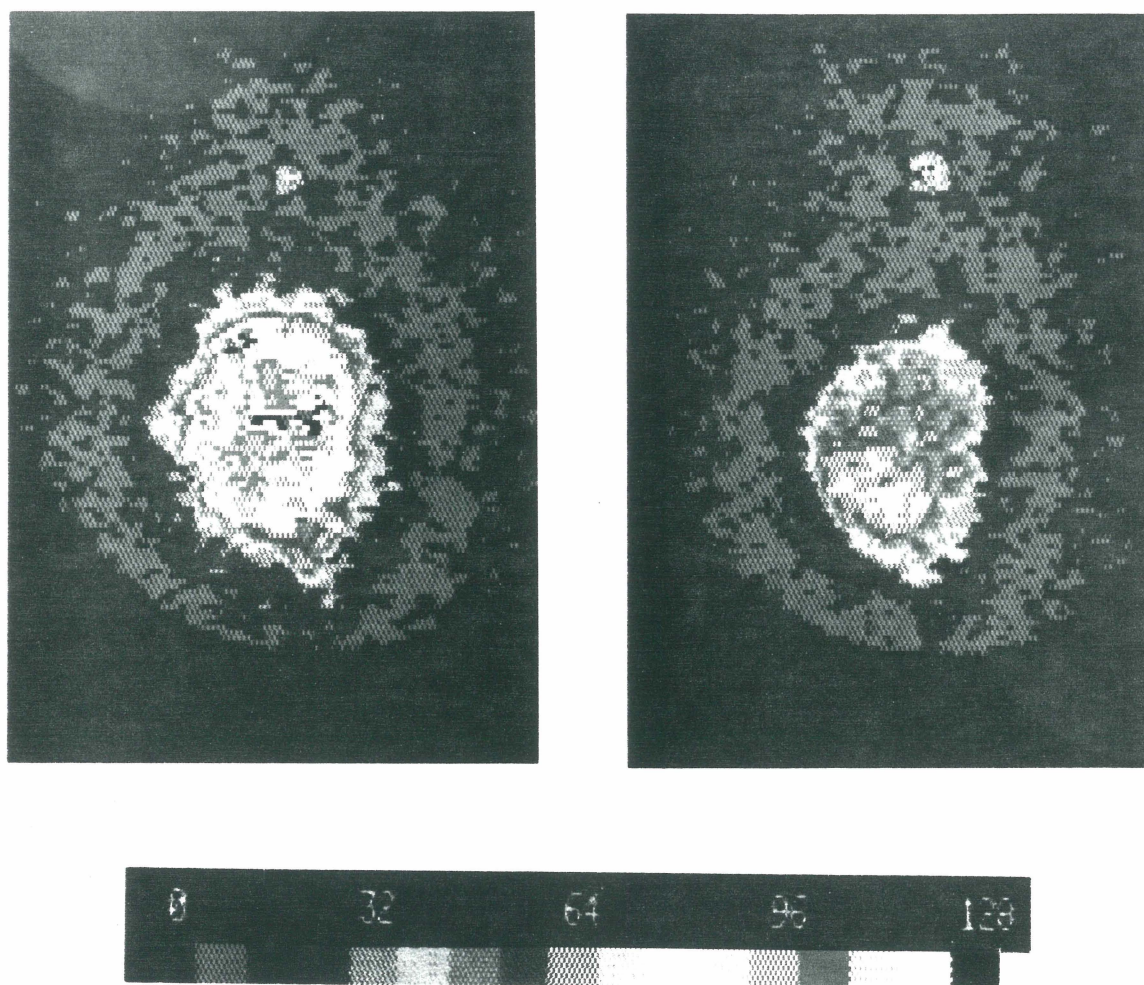


Figure 70. Biodistribution du ^{131}I -ICI ou de ses métabolites 24 heures après administration i.v.

Le ^{131}I -ICI fut administré seul (gauche) ou en présence de 2 mg de naloxone (droite). Sans compétiteur, l'activité s'est accrue au niveaux de certaines structures de l'intestin mais s'est atténuée au niveau hépatique. La thyroïde est marquée mais son activité est inférieure à 2% de la dose initiale administrée. Le naloxone semble avoir réduit l'activité intestinale considérablement.

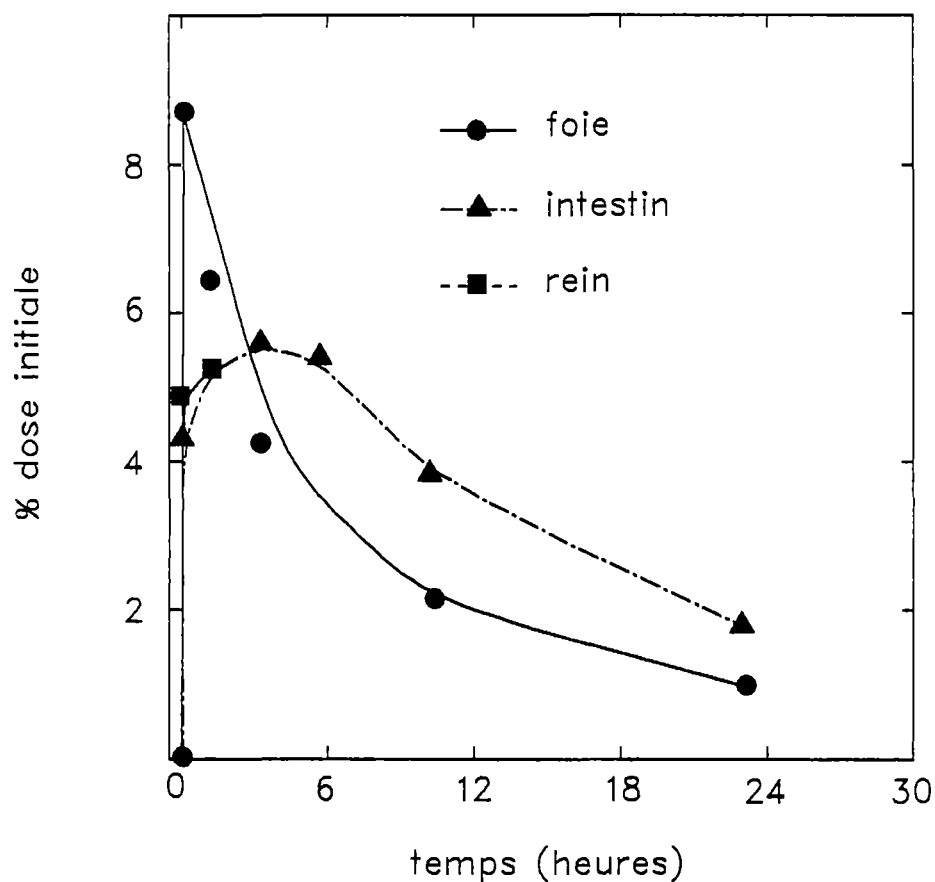


Figure 71. Biodistribution du ^{131}I -ICI ou de ses métabolites après administration i.v.

On dénote une accumulation rapide de radioactivité au foie (9% de la dose initiale) et au rein (5% de la dose initiale). Une accumulation plus lente est observée dans l'intestin (5.5% de la dose initiale). Les temps de demi-vie hépatique et intestinale sont d'environ 5 et 18 heures respectivement.

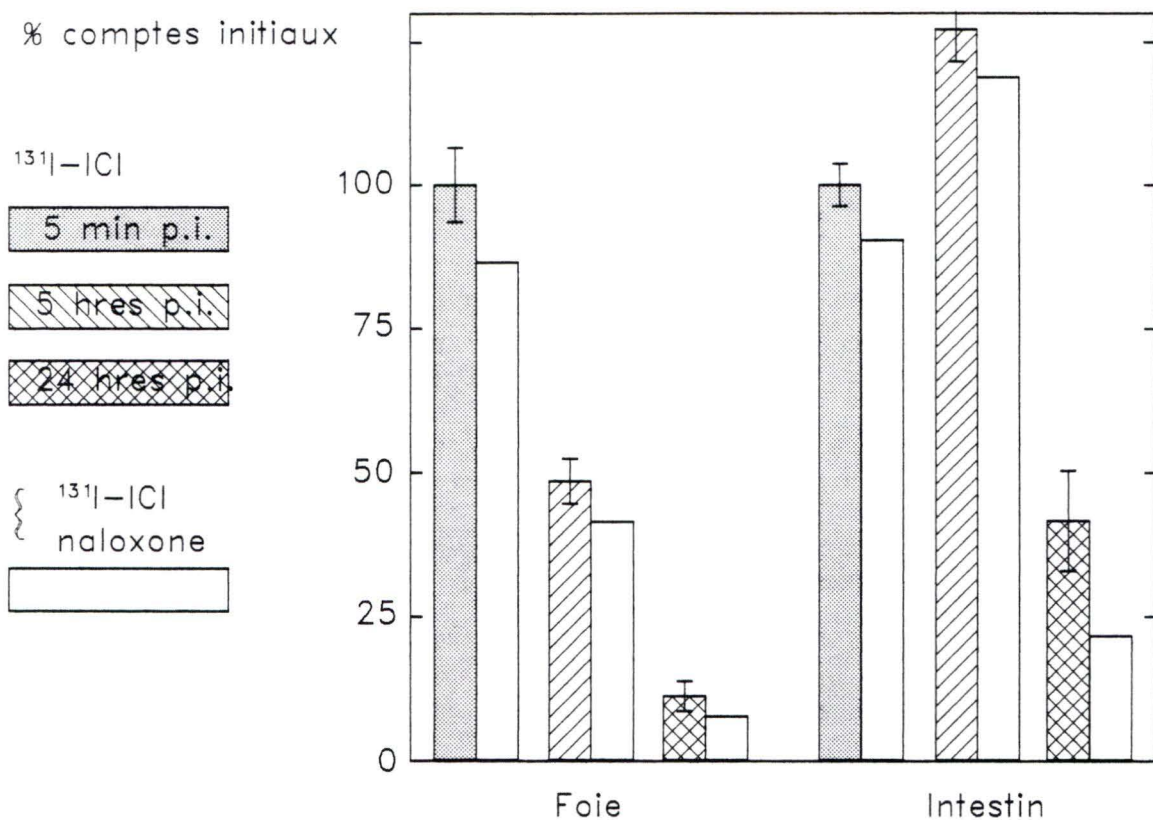


Figure 72. Effet du naloxone sur la présence du $^{131}\text{I-ICI}$ ou de ses métabolites au foie et à l'intestin.

Les comptes imputables à la présence du $^{131}\text{I-ICI}$ ou de ses métabolites sont représentés en ordonnée et relativisés en % des comptes initiaux moyens trouvés dans l'organe exempt de compétiteur. L'atténuation de l'activité au foie par le naloxone fut maximale à 5 min p.i. atteignant une valeur supérieure à 15%. L'atténuation de l'activité dans l'intestin fut optimale à 24 hres p.i., atteignant une valeur d'environ 50%. Il est à noter qu'après 24 heures, les niveaux totaux de radioactivité des organes étudiés ont diminué. L'atténuation du signal atteint environ 85% pour le foie et approximativement 60% pour le rein.

une valeur supérieure à 15%. L'atténuation de l'activité dans l'intestin fut optimale à 24 hres p.i., atteignant une valeur d'environ 50%. Il est à noter que l'activité intestinale résiduelle ne représente que 40% de l'activité initialement enregistrée à 5 min. p.i.). L'analyse par HPLC des composés excrétés dans l'urine démontre la présence de composés plus hydrophiles que le ^{131}I -ICI (fig. 73). La nature des métabolites semble changer en fonction du temps: ceux de 6 heures sont plus hydrophiles que ceux de 1 et 3 heures. La mesure du niveau de radioactivité des fèces indiqua une présence très faible de composés radioactifs ne permettant pas leur analyse par HPLC.

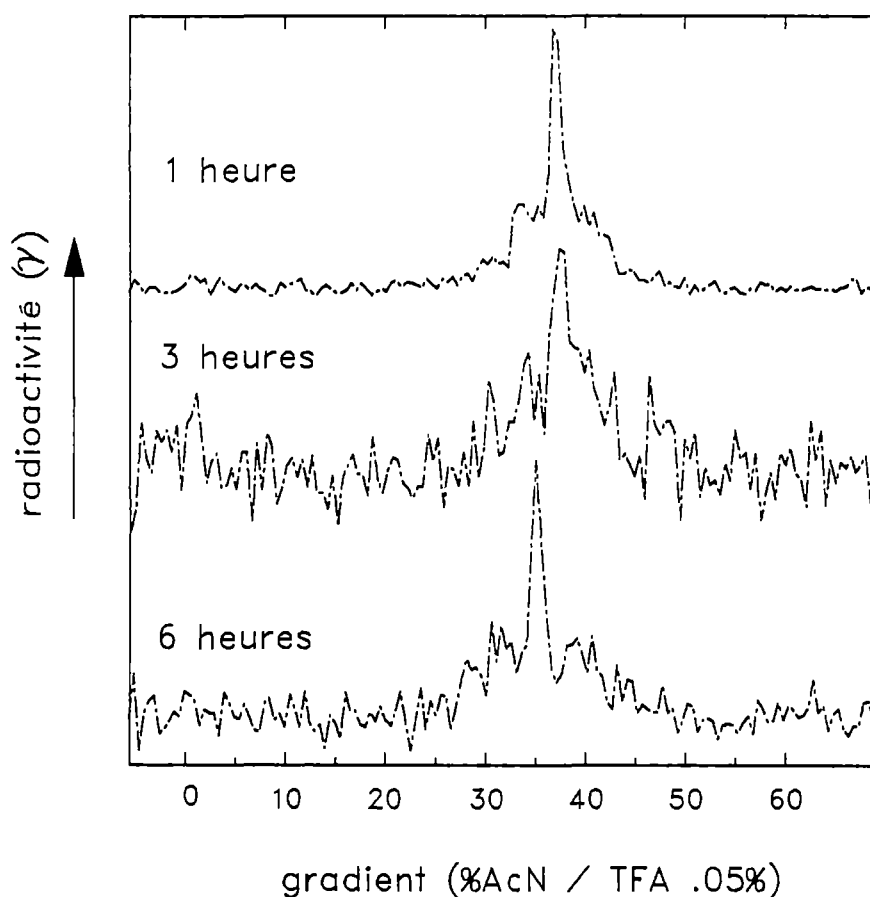


Figure 73. Analyse qualitative par HPLC du contenu radioactif urinaire suite à l'administration i.v. du ^{131}I -ICI.

Profil d'élution en HPLC où le niveau de radioactivité (γ) est présenté en ordonnée et le gradient d'acétonitrile (%) indiqué en abscisse. L'urine a été récoltée à 1, 3, et 6 heures p.i. On dénote la présence de composés plus hydrophiles que le ^{131}I -ICI (élution inférieure à 40% AcN). La nature des métabolites semble changer en fonction du temps: ceux de 6 heures sont plus hydrophiles que ceux de 1 et 3 heures.

DISCUSSION

Iodations par la réaction de Gatterman/Sandmeyer.

Le marquage des divers ligands par la réaction de Gatterman/Sandmeyer a produit des radioligands avec des rendements s'échelonnant entre 40 et 75%. Le sommaire des marquages et des essais biologiques de ces ligands sont résumés au tableau 2. Se basant sur les chromatogrammes faits à partir des aliquots des mélanges réactionnels, on peut établir un rendement des marquages. Ce rendement s'exprime comme le rapport de la surface du pic caractérisant le radioligand sur la surface totale des pics constituant le chromatogramme. Les facteurs qui peuvent faire varier les rendements sont: la quantité de ligand, la quantité d'iode radioactive, la pureté de l'iode radioactive ("carrier-free"), la surface des particules du catalyseur de Cu, la durée de la réaction, la température utilisée, le pH de la solution, la présence d'éléments compétiteurs (I, Cl, F, Br) déjà présents dans l'H₂O, etc. De plus, le mécanisme de la réaction de Gatterman/Sandmeyer est complexe parcequ'il invoque, entre autres, des étapes de catalyse par le Cu peu connues. L'analyse de chacun des facteurs mentionnés précédemment aurait pu constituer le sujet d'une étude. Comme ceci n'était pas le but principalement visé par le présent projet, nous nous sommes prioritairement concentrés sur la recherche d'une "fenêtre" opérationnelle adéquate pouvant nous permettre d'obtenir une quantité raisonnable, au moins 250 μ Ci (dose limite injectable permise par l'organisme interne régissant l'emploi des radioisotopes lors de l'élaboration du projet) de radioligand à

¹²⁵ I-Ligand	Type ⁽¹⁾	N	(%) ⁽²⁾	P ⁽³⁾	Kd (nM)	Tissu (Espèce)	Liaison (%)		HPLC gradient (%AcN)
							totale	spécifique	
Ang	G/S	4	48±8	1.20±.02	(1) 1.0±0.5	surrénales (boeuf)	26±4	15±2	40
PD123177	G/S	2	42±5	1.59±.08	n.d.	surrénales (boeuf)	13±4	4±2	34
BPA-Ang	I-G	2	75±4	n.d.	(1) 0.7±0.1	surrénales (boeuf)	41±5	29±4	36
Leu-Enk	G/S	2	55±3	1.45±.03	(1) 0.7±0.2 (2) 5.3±1.5	cerveau (rat)	20±4	10±2	38
DPDP	G/S	5	59±6	1.56±.01	(1) 1.6±0.4	cerveau (rat)	11±2	8±2	39
DALDA	G/S	3	50±5	-1.27±.05	(1) 8.5±2.0	cerveau (rat)	8±2	3±2	29
YaFF	G/S	3	60±7	1.50±.01	(1) 10.1±2.0	cerveau (rat)	8±2	3±2	43
ICI	G/S	4	51±4	1.28±.04	(1) 0.5±0.1 (2) 3.1±0.9	cerveau (cobaye)	19±3	13±2	41
BK	G/S	4	43±3	0.39±.03	(1) 0.3 pM (2) 1.1	iléon (cobaye)	30±4	25±3	32
VP	G/S	1	75	n.d.	(1) 1.0	foie (rat)	60	50	50

Tableau 1. Résumé des propriétés des différents composés marqués.

⁽¹⁾ Type de marquage: G/S=Gattermann/Sandmeyer, I-G=Iodo-Gen

⁽²⁾ Rendement de la réaction (%)

⁽³⁾ Coefficient de partition exprimé comme le rapport $[\text{ligand}]_{\text{octanol}}/[\text{ligand}]_{\text{eau}}$

radioactivité spécifique intéressante (>500 Ci/mmol).

Nous nous sommes inspirés à la fois de travaux faits dans nos laboratoires (ESCHER, 1984) et d'une méthode ayant permis la bromination de l'haloperidol par la réaction de Sandmeyer utilisant des particules de Cu comme catalyseur (SUEHIRO et coll., 1987). Comme l'haloperidol est un composé non-peptidique, ces gens ont pu employer une température réactionnelle élevée (80°C) et un milieu très acide (H_2SO_4 2M, $\text{pH}\approx 0$). Puisque ces conditions représentaient un risque majeur d'hydrolyser les peptides et de causer certaines réactions secondaires, nous avons dû atténuer ces conditions. Nous avons, dans un premier temps, employé un milieu moins acide (H_2SO_4 1M) et une température de 45°C). Nous avons, dans ces conditions, iodé: l'Ang, la VP, l'Enk, le DPDP, le DALDA et le YaFF. Nous avons obtenus des radioligands fonctionnels dans chacun des cas. L'activité spécifique de ces ligands varia de 500-1750 Ci/mmol. Cependant on pouvait dénoter la présence de plusieurs sous-produits réactionnels originant soit d'une hydrolyse partielle ou de certaines réactions secondaires (ex. sulfonation). L'iodation du PD123177 et du ICI-201163 furent aussi pratiquées dans ces conditions, mais aucun radioligand fonctionnel ne fut obtenu.

Il fut décidé d'atténuer encore plus les conditions réactionnelles. Cela fut fait en abaissant la température à 4°C et en diminuant la concentration du H_2SO_4 à 0.1N. Toutefois une augmentation du temps de réaction s'avérait nécessaire étant donné l'utilisation d'une température beaucoup plus basse (facteur 10). En faisant un contrôle du contenu du mélange réactionnel en fonction du temps, il s'avéra que nous

devions utiliser un temps de réaction supérieur à 6 heures afin d'obtenir une quantité adéquate de produit marqué. L'iodation du PD123177 et du ICI-201163 fut refaite dans ces conditions. Dans chaque cas des radioligands fonctionnels furent obtenus. Un marquage de la BK fut aussi réussi dans ces conditions. Fait important à noter: beaucoup moins de sous-produits (en quantité et en nombre) surviennent dans ces conditions. On peut expliquer l'amélioration des résultats par une diminution des risques d'hydrolyse (peptides), une réduction des réactions secondaires (peptides et non-peptides) ainsi que par l'augmentation de la demi-vie de l'intermédiaire diazophényl.

Bien que la radioactivité spécifique du ^{125}I soit de 2200 Ci/mmol, nous n'avons jamais obtenu de ligand de cette activité contrairement à certains groupes utilisant notre approche (KNAPP et coll., 1992). La radioactivité spécifique moyenne de nos ligands est d'environ 1300 Ci/mmol. L'obtention d'un radioligand dont l'activité est inférieure à celle du ^{125}I témoigne de la présence de ligand non-radioactif contaminant. Ce ligand contaminant provient du marquage et ne peut être totalement séparé du radioligand lors des étapes de purification. Bien que les dérivés aminophényles sont bien séparables des dérivés iodophényles à en juger par les chromatogrammes présentés à la section résultats, l'utilisation d'une quantité relativement importante de ligand pour le marquage (500 μg vs 50-100 μg avec Iodo-Gen), peut être en partie responsable de la contamination. Des sous-produits sulfophényles issus d'une réaction secondaire seraient beaucoup moins bien séparés lors de la purification par HPLC et pourraient contaminer le radioligand. La présence d'iode non-radioactif peut avoir contribué à l'obtention de ligand iodé non-

radioactif. En effet le ^{125}I et/ou l'eau utilisés lors de la réaction pouvaient contenir certains éléments halogènes contaminants (Cl,I,F,Br) qui, même sous forme de traces, auraient pu compétitionner avec le ^{125}I occasionnant la production de ligand fonctionnel non-radioactif. Puisque la radioactivité spécifique moyenne des peptides marqués par la réaction de Gatterman/Sandmeyer ($\approx 1300 \text{ Ci/mmol}$) est inférieure à celle normalement observée lors des marquages à l'Iodo-Gen ($\geq 1500 \text{ Ci/mmol}$), on peut supposer que la contamination origine de l'eau.

Nous avons obtenus une bonne qualité de liaison avec la majorité des radioligands, leur liaison spécifique représentant plus des 2/3 de leur liaison totale. Seuls le PD123177, le DPDP et le DALDA firent exception, leur liaison spécifique ne représentant que 1/3 de leur liaison totale. Deux facteurs peuvent expliquer ce comportement: l'hydrophobicité des composés iodés et la quantité de préparation membranaire des solutions dans lesquelles se firent les incubations lors des essais de liaison. Plus un composé est hydrophobe plus il a tendance à s'adsorber au filtres de fibre de verre utilisés lors des essais de liaison. Si on utilise une importante quantité de membranes lors des essais de liaison, plus grandes sont nos chances d'obtenir un haut niveau de non-spécificité de liaison. 2 des 3 radioligands au comportement anarchique (PD123177 et YaFF) sont relativement hydrophobes ayant tous deux des logarithmes des coefficients de partition environnant 1.5. Des préparations membranaires non-purifiés ("crude") de synaptosomes de rats furent utilisées lors des essais de 2 des 3 radioligands mentionnés auparavant (YaFF et DALDA). Ces préparations membranaires, faibles en contenu protéique (récepteurs), sont par contre très riches en lipide (myéline, etc) et entraînent inévitablement un haut niveau de

liaison non-spécifique.

Iodation de ligands pour la caractérisation des récepteurs de l'Ang.

Jusqu'à très récemment, aucune évidence prouvait l'existence de plusieurs types de récepteurs pour l'angiotensine II (Ang). L'émergence de plusieurs ligands sélectifs permit de montrer qu'au moins deux types de récepteurs liaient l'Ang. Le récepteur AT₁ médie toutes les réponses biologiques connues de l'Ang. On le retrouve majoritairement au niveau des vaisseaux sanguins, du foie, des glandes surrénales et dans une plus faible proportion dans le muscle utérin. Les sources principales de récepteurs AT₂ sont le tronc cérébral et l'utérus (WHITEBREAD et coll., 1989). Nous avons entrepris l'iodation de 3 nouveaux analogues de l'Ang. Deux marquages par la réaction de Gattermann /Sandmeyer ont d'abord été envisagés: soit ceux du [Sar¹, Val⁵, NO₂-D-Phe⁸]Ang (NO₂-Ang) et du PD123177 (BLANKLEY et coll., 1991). L'iodation du NO₂-Ang nous permettrait de comparer le potentiel d'un radioligand marqué sur un résidu Phe à celui des marqueurs déjà éprouvés et iodés conventionnellement. Le marquage du PD123177 permettrait d'obtenir un traceur sélectif pour les récepteurs de type AT₂. Un dernier radioligand serait fait par marquage conventionnel d'un analogue de l'Ang porteur d'un nouveau résidu photoactivable, le p-benzoylphénylalanine (Bpa). Le Bpa intégré à la structure d'autres ligands a permis l'obtention de très hauts degrés d'incorporation ligand-récepteur (BOYD et coll.-1991, McNicoll et coll.-1992). Le Bpa-Ang pourrait enfin permettre le photomarquage du récepteur AT₂ car, à ce jour, tous les essais faits avec

les radioligands photoactivables disponibles se sont avérés négatifs (BOSSÉ et coll., 1993). Dans tous les cas, nous avons choisi la préparation classique de cortex surrénalien bovin pour fin d'études préliminaires de liaison de nos ligands. Bien que le cortex surrénalien soit surtout riche en récepteurs de type AT₁, diverses sources ont rapporté l'existence d'une quantité de récepteurs de type AT₂. Ils représenteraient environ 20-25% du contenu total en récepteur de l'Ang (CHIU et coll., 1989). Nous avons vérifié le contenu en récepteurs de types AT₁ et AT₂ présents dans notre préparation membranaire par déplacement du [Sar¹, ¹²⁵I-Tyr⁴, Val⁵, D-Phe⁸]Ang par le L-158,809 (AT₁, MANTLO et coll.-1991) et le PD123177 (AT₂). Nous sommes arrivés aux mêmes valeurs rapportées par CHIU et coll.

Iodation du [Sar¹, Val⁵, NO₂-D-Phe⁸]Ang (NO₂-Ang) par la réaction de Gatterman/Sandmeyer et essais de liaison du radioligand obtenu.

L'iodation de l'Ang a produit un radioligand fonctionnel (¹²⁵I-Ang) dont le K_d fut évalué à 1 nM. Nous avons antécédemment estimé l'affinité du même ligand sous sa forme non-radioactive (I-Ang) à 0.6 nM par déplacement du [Sar¹, ¹²⁵I-Tyr⁴, Val⁵, D-Phe⁸]Ang sur des membranes de cortex surrénalien bovin (BOSSÉ, 1989). La quantité de sites touchés par le ¹²⁵I-Ang varie de 0.50 à 0.75 pmol/mg prot. suivant les essais. Cette valeur est comparable à celle que nous avons évalué à l'aide du [Sar¹, ¹²⁵I-Tyr⁴, Val⁵, D-Phe⁸]Ang et qui se chiffrait en moyenne à 0.68 pmol/mg prot. (BOSSÉ, 1989). GLOSSMANN et coll. (1974) avait obtenu une valeur de 0.62 pmol/mg prot. pour la même caractérisation. Nous avons noté une variation d'un facteur 5 de l'IC₅₀ du D-Phe-Ang utilisé comme compétiteur en fonction du traceur utilisé (fig.15, 3 nM avec vs 15 nM avec ¹²⁵I-Ang). Ceci peut

s'expliquer par une variation de l'activité spécifique des deux traceurs et/ou de leur Kd respectifs comme le dicte la règle de CHENG-PRUSSOFF (1973):

$$Kd = IC_{50} \times \frac{Kd^*}{Kd^* + [H^*]} \quad \rightarrow \quad IC_{50} = \frac{Kd^* + [H^*]}{Kd^*} \times Kd$$

Les termes Kd et IC₅₀ représente respectivement la constante d'affinité et la mesure d'affinité apparente du compétiteur non-radioactif (D-Phe⁸-Ang). Les expressions Kd* et [H*] décrivent respectivement la constante d'affinité et la concentration du radioligand utilisé. En consultant la formule citée précédemment, on constate que l'augmentation de la concentration d'un traceur peut provoquer une hausse de l'affinité apparente d'un compétiteur. La radioactivité spécifique du ¹²⁵I-Ang (450 Ci/mmol) est 3 fois inférieure à celle du [Sar¹, ¹²⁵I-Tyr⁴, Val⁵, D-Phe⁸]Ang (1500 Ci/mmol) et dans chaque cas, nous avons utilisé la même activité en radioligand (50,000 CPM/tube). Alors 3 fois plus de ¹²⁵I-Ang fut employé ce qui pu, en partie, engendrer la hausse de l'IC₅₀ du D-Phe⁸-Ang. Le ¹²⁵I-Ang ne s'est pas révélé sélectif envers l'AT₁ ou l'AT₂ dans le cadre de nos essais, puisque les courbes de Scatchard se sont avérées rectilignes.

Iodation conventionnelle du [Sar¹, Val⁵, Bpa⁸]Ang (Bpa-Ang) avec Iodo-Gen et essais de liaison du radioligand obtenu.

Lors des essais biologiques faits sur l'aorte de lapin, un tissu riche en récepteurs AT₁, nous nous sommes aperçu que le Bpa-Ang se comportait comme un antagoniste spécifique et irréversible. Ce comportement est semblable à celui d'autres antagonistes modifiés en position 1 par un résidu Sar et en position 8 par des substituants hydrophobes et plutôt encombrants (ESCHER et coll.-1980, HOLCK et

coll. 1989). Des essais de liaison tenus avec une préparation membranaire de cortex surrénalien bovin, où les traceurs utilisés étaient le [Sar¹, ¹²⁵I-Tyr⁴, Val⁵, D-Phe⁸]Ang ou le ¹²⁵I-Bpa-Ang, ont révélé que le Bpa-Ang déplaçait le traceurs avec une affinité comparable. Le ¹²⁵I-Bpa-Ang ne s'est pas révélé sélectif envers l'AT₁ ou l'AT₂ dans le cadre de nos essais. Les courbes de Scatchard, issues de saturations menées avec le ¹²⁵I-BpaAng, se sont avérées rectilignes. A l'aide du ¹²⁵I-Bpa-Ang, le récepteur de type AT₂ fut finalement photomarké par des collègues. Ceux-ci obtinrent un niveau d'incorporation de 75%. (BOSSÉ, 1993)

Iodation du PD123177 par la réaction de Gattermann/Sandmeyer et essais de liaison du radioligand obtenu.

Le marquage du PD123177 à 45°C dans le H₂SO₄ 1N a produit des composés iodés non-fonctionnels vis-à-vis les récepteurs de l'Ang. En atténuant les conditions expérimentales (4°C et H₂SO₄ 0.1N) nous avons produit un dérivé iodé du PD123177 (¹²⁵I-PD123177) pouvant se lier aux récepteurs de l'Ang sur une préparation membranaire de cortex surrénalien bovin. Nous n'avons pas eu l'occasion de tester le radioligand sur des tissus plus riches en récepteur AT₂ (eg. utérus) parcequ'au moment où furent menées ces expériences, nous n'avions pas à notre disposition une telle préparation. La liaison totale du ¹²⁵I-PD123177 à une préparation non-purifiée ("crude") de cortex surrénalien comporte une composante non-spécifique très élevée. Une grande hydrophobicité, engendrée en partie par la substitution du groupement amine de la fonction aniline par un atome d'iode, pourrait en être la cause. La faiblesse du signal obtenu engendre une variation importante des points constituants les courbes de déplacement du marqueur par le D-Phe-Ang.

Iodation du [Dmpa¹,NO₂-Phe²,Val⁴,Lys⁸,D-Tyr⁹]VP (NO₂-VP) par la réaction de Gattermann/Sandmeyer et essais de liaison du radioligand obtenu.

L'iodation de la VP a produit un radioligand fonctionnel (¹²⁵I-VP) dont le K_d fut évalué à 1 nM. Le ¹²⁵I-VP est aussi puissant que le composé dont il est issu: le [Dmpa¹,NO₂-Phe²,Val⁴,Lys⁸,D-Tyr⁹]VP (BARBEAU, 1991). Ceci fait du ¹²⁵I-VP l'un des plus puissants radioligands iodés de la vasopressine. La quantité de sites touchés par le ¹²⁵I-VP fut d'environ de 0.9 pmol/mg prot. Cette valeur est comparable à celles fréquemment publiées (FISCHMANN et coll., 1987). Puisque la courbe de Scatchard est rectiligne, le ¹²⁵I-VP ne touche qu'une population homogène de récepteurs. Ceci corrobore l'existence prédominante des récepteurs à la vasopressine de type V₁ (V_{1a}) dans le foie de rat (PHILLIPS et coll., 1990 et JARD et coll., 1986). Nous ne pouvons cependant affirmer que le ¹²⁵I-VP est sélectif envers le récepteur de type V₁ puisque nous n'avons pas encore procédé à sa caractérisation sur une préparation tissulaire riche en récepteurs V₂. Le rein serait un tissu tout-à-fait approprié pour cette étude (PHILLIPS et coll., 1990). Comme c'était le cas pour l'Ang, on dénote une modification de l'IC₅₀ du compétiteur (AVP) en fonction du traceur utilisé. Une fois de plus l'influence de la quantité des traceurs utilisés en fonction de leurs radioactivités spécifiques respectives serait un des facteurs à la source de ce phénomène.

Iodation de ligands pour les récepteurs des opiacés.

Les opiacés sont des composés où perdure depuis longtemps un manque flagrant de

radioligand à haute radioactivité spécifique. Sauf exception (YEUNG, 1984), il est bien connu que l'addition d'un atome d'iode sur le résidu Tyr en position 1 des analogues de types enképhaline et β -endorphine détruit l'activité de liaison de ces composés (SIMON, 1991). Il existe au moins 4 types de récepteurs opiacés: μ (pour morphine), δ (pour déferens), κ (pour ketocyclazocine) et σ (pour SKF-10047 ou N-allylnormetazocine). Nous avons choisi des composés qui avaient la capacité de se lier sélectivement à un des récepteurs précédemment mentionnés. Le DALDA et le NO₂-YaFF furent sélectionnés à titre de sélectifs μ . Le DALDA et le NO₂-YaFF démontrent des capacités respectives de 11,000 et 129 fois supérieures de se lier aux récepteurs μ plutôt qu'aux récepteurs δ dans le cerveau de rat, l'iléon de cobaye ou le vas deferens de souris (SCHILLER et coll., 1988). Le DPDP fut sélectionné à titre de sélectif δ (MOSBERG et coll., 1983).

Le composé non-peptidique ICI-201163 fut choisi à titre de sélectif κ (BARLOW et coll., 1991). Les composés μ et δ ont été étudiés chez le cerveau de rat et de lapin. Pour des fins comparatives et étant donné que le cerveau de rat est le tissu cité préférentiellement dans la littérature, seuls les résultats obtenus avec ce tissu sont inclus et discutés dans le présent ouvrage. Le composé sélectif κ fut analysé chez le cerveau de cobaye (cervelet inclus).

Analyse des récepteurs des opiacés chez le cerveau de rat à l'aide d'essais de liaison du ³H-naloxone.

Nous avons procédé à cette étude dans le but de comparer subséquemment la liaison des radioligands sélectifs μ et δ aux synaptosomes de rat. Nous avons choisi

le ^3H - naloxone comme traceur parceque ce composé se lie aux récepteurs μ , δ et κ où il est antagoniste (MARTIN, 1967). Bien que le naloxone se lie préférentiellement aux récepteurs de type μ , il ne lui est cependant pas sélectif. Les courbes de Scatchard tirées des expériences de saturation faites avec le ^3H -naloxone sont curvilignes. Elles indiquent une liaison du naloxone à une population hétérogène de récepteurs se chiffrant à 125-150 fmol/mg de prot. Les sites à haute affinité (récepteurs μ) représentent environ 1/3 de la population et le naloxone s'y lie avec un K_d de 0.5 nM. Le naloxone se lie aux 2/3 restants (récepteur δ et κ) avec un K_d de 4.16 nM. PASTERNAK et coll. (1975) estimèrent à l'affinité du naloxone à 1.6 nM envers une population homogène de récepteurs se chiffrant à 125 fmol /mg prot. Toutefois, ce groupe ne présente que des courbes de Scatchard faites avec seulement 3 points, ce qui rend laborieux toute corrélation multiréceptorielle. CLARK et coll. (1988) prétendent que jusqu'à 75% des sites du cerveau de rat peuvent être de type μ et ce, par liaison du ^3H -Sufentanil (sélectif μ).

Iodation du $[\text{NO}_2\text{-Phe}^4, \text{Leu}^5]\text{Enképhaline}$ ($\text{NO}_2\text{-Enk}$) par la réaction de Gattermann/Sandmeyer et essais de liaison du radioligand obtenu.

Le $[\text{Leu}^5]\text{enképhaline}$ (Enk) est un agoniste interagissant préférentiellement aux sites δ (YEUNG, 1984). Nos résultats indiquent que le ^{125}I -Enk se lie à une population hétérogène de récepteurs sur les synaptosomes de rats. La liaison totale du radioligand est d'environ 100 fmol/mg prot. Le ^{125}I -Enk se lie à 25% des sites avec un K_d de 0.7 nM (haute affinité) et au 75% restant avec une affinité de 5.3 nM (basse affinité). YEUNG (1984) a iodé le $[\text{D-Ala}^2, \text{Met}^5]\text{enképhaline}$ par voie conventionnelle sur un résidu Tyr. Son radioligand se lia à 30 fmol/mg prot. avec

un Kd de 3.58 nM. Ce résultat est corroboré en partie par nos travaux puisque notre ligand touche un nombre de sites du même ordre de grandeur. Cependant le ^{125}I -Enk possède une affinité 10 fois supérieure à celle du ligand de YEUNG vis-à-vis le sites touchés, qui sont présumément de type δ . Nous demeurons prudents quant aux comparaisons faites avec les résultats de YEUNG. Aucun autre groupe n'a affirmé avoir réussi la production d'un radioligand fonctionnel en iodant un analogue de l'enképhaline sur le résidu Tyr¹.

Iodation du [D-Pen^{2,5},NO₂-Phe⁴]enképhaline (NO₂-DPDP) par la réaction de Gattermann/Sandmeyer et essais de liaison du radioligand obtenu.

Le groupe de MOSBERG et coll. (1983) synthétisèrent une série d'analogues cycliques de l'enképhaline. Parmi ceux-ci, Le [D-Pen^{2,5}]enképhaline (DPDP) démontra une sélectivité envers le récepteur δ supérieure à 3000 en essai biologique et près de 200 par essai de liaison. Nous avons iodé le DPDP à partir d'un de ses analogues le [D-Pen^{2,5},NO₂-Phe⁴]enképhaline (NO₂-DPDP). Nous avons obtenu un radioligand d'excellente radioactivité spécifique (≈ 1500 Ci/mmol) se liant avec un Kd de 1.6 nM à une population homogène de récepteur se chiffrant à environ 45-50 fmol/mg prot. Peu après, TOTH et coll.(1990) étudièrent une série d'analogues du DPDP ou le résidu Phe en position 4 était monsubstitué en para par divers éléments halogènes dont l'iode. Ces substitutions haussèrent le niveau de sélectivité du DPDP envers les récepteurs δ . Cependant l'iode est l'élément halogène qui a le moins accru la sélectivité. Un radioligand issu de cette famille, le ^3H -[D-Pen^{2,5},Cl-Phe⁴]enképhaline (^3H -(Cl)DPDP), se lia avec un Kd de 0.3 nM à une population homogène de récepteurs se chiffrant à 87 fmol/mg prot. (VAUGHN et coll., 1989).

Ceci corrobore l'estimation que nous avons fait du nombre de sites auxquels se lie le DPDP. Cependant leur ligand tritié possède une affinité 4 fois supérieure à notre ligand iodé. Ceci confirme le facteur 3 issu du rapport des IC_{50} qu'ils obtinrent par déplacement du 3H -DPDP avec le DPDP chloré (1.57 nM) et iodé (4.74 nM). En 1991, le même groupe (KNAPP et coll.) marquèrent le DPDP d'une façon analogue à notre méthode mais, en employant comme catalyseur, des particules de Cu solubilisées à l'aide d'un éther-couronne. Ils récoltèrent aussi un excellent radioligand. Ils estimèrent son activité spécifique à 2200 Ci/mmol. Ce ligand se lia à une population homogène de récepteurs se chiffrant à 41 fmol/mg prot. avec une affinité de 0.4 nM (0.6 nM en se fiant à leur courbe de Scatchard). KNAPP et coll. n'expliquent pas pourquoi leur ligand iodé possède une affinité égale à celle du 3H -(Cl)DPDP, ce qui contredit leur résultat obtenu par déplacement du DPDP tritié. Ils imputent à l'utilisation de cerveaux entiers de rats l'obtention d'une liaison totale du ^{125}I -DPDP inférieure à celle du 3H -(Cl)DPDP. Ceci est surprenant puisque nous avons aussi utilisé des cerveaux entiers de rats. Nous avons observé que le naloxone avait une affinité près de 10 fois moindre que le I-DPDP par déplacement du ^{125}I -DPDP. Le déplacement suscité par le naloxone couvre 4 unités logarithmiques. Cela pourrait signifier que le ^{125}I -DPDP pourrait se lier sur une population éventuellement hétérogène de récepteurs indifférenciable par le DPDP.

Iodation du Tyr-D-Arg-(NO₂)Phe-Lys (NO₂-DALDA) et du Tyr-D-Ala-Phe-NO₂Phe (NO₂-YaFF) par la réaction de Gattermann/Sandmeyer et essais de liaison des radioligands obtenus.

Le DALDA et le YaFF sont tous deux des agonistes sélectifs de type μ conçus par SCHILLER (1988). Ils ont des caractères chimiques totalement opposés:

le DALDA est hydrophile ($P=1.27$) alors que le YaFF est hydrophobe ($P=1.28$). Le ^{125}I -DALDA s'est lié avec un K_d de 8.5 nM à une population homogène de récepteurs se chiffrant entre 100 et 125 fmol/mg prot. L'affinité du I-DALDA est inférieure à son précurseur, le DALDA, dont le K_i fut évalué par Schiller à 1.69 nM. Puisque le DALDA est un agoniste, il se peut qu'une différence de couplage des effecteurs membranaires (eg. protéine G) existant entre les préparations utilisées par Schiller et les nôtres, soit la cause du phénomène. Ceci pourrait aussi expliquer que le naloxone a démontré plus de facilité à déplacer le ^{125}I -DALDA comme en fait foi un IC_{50} moyen de 1 nM. Le déplacement suscité par le naloxone couvre 4 unités logarithmiques suggérant que le ^{125}I -DALDA pourrait se lier à une population de récepteurs hétérogène indifférenciable par le I-DALDA. Le I-DPDP n'a pas provoqué de déplacement du ^{125}I -DALDA jusqu'à une concentration 100 nM, confirmant que le radioligand n'interagit pas d'une façon fonctionnelle avec les récepteurs δ . Le ^{125}I -DALDA a suscité un haut niveau de liaison non-spécifique: plus des 2/3 de la liaison totale! La composition du tampon (PATERSON, 1990) et les cations ont tendance à moduler la liaison des agonistes opiacés (PATERSON, 1990 et PASTERNAK, 1974). Nous avons donc procédé à un essai de liaison du ^{125}I -DALDA en présence et en absence de NaCl et de BSA. Nous avons constaté une légère, mais significative, augmentation de la liaison spécifique du radioligand de l'ordre de 10%. L'augmentation résulte d'une baisse de la liaison non-spécifique, la liaison totale ne variant pas significativement. Nous avons donc procédé à la caractérisation du ^{125}I -DALDA en absence de BSA et de NaCl.

Bien que différent chimiquement, le ^{125}I -YaFF a montré des caractéristiques

pharmacodynamiques similaires au ^{125}I -DALDA; dont une haute liaison non-spécifique qui n'a cependant pas changé significativement par une soustraction du BSA et du NaCl. Pour fin comparative, nous avons tout de même procédé à la caractérisation du ^{125}I -YaFF en absence de BSA et de NaCl. Le ^{125}I -YaFF s'est lié avec un K_d de 10 nM à une population homogène de récepteurs se chiffrant entre 80 et 110 fmol/mg prot. L'affinité du I-YaFF est aussi inférieure à son précurseur, le NO_2 -YaFF, dont le K_i fut évalué par Schiller à 0.5 nM. Là aussi, l'hypothèse alléguant une différence de couplage des effecteurs membranaires entre les préparations utilisées par Schiller et les nôtres, pourrait être cause du phénomène et aussi expliquer la facilité avec laquelle le naloxone a déplacé le ^{125}I -YaFF (IC_{50} moyen 3 nM). Le déplacement suscité par le naloxone couvre, une fois de plus, 4 unités logarithmiques suggérant que le ^{125}I -YaFF pourrait aussi se lier à une population de récepteurs hétérogène indifférenciable par le I-YaFF. Le I-DPDP n'a pas provoqué de déplacement du ^{125}I -YaFF jusqu'à une concentration 100 nM, confirmant que le radioligand n'interagit pas d'une façon fonctionnelle avec les récepteurs δ .

Iodation du N-méthyl-N-[(1R,S)-1-(3-aminophényl)-2-(1-pyrrolidinyl)éthyl]acétamide (M201163 ou NH_2 -ICI) par la réaction de Gattermann/Sandmeyer et essais de liaison du radioligand obtenu.

Le NH_2 -ICI est un agoniste sélectif des récepteurs κ élaboré par la compagnie ICI Pharmaceuticals (Angleterre). Les essais de liaison du ^{125}I -ICI furent faits à partir d'une préparation membranaire de cerveau entier de cobaye. Le cerveau de cobaye est un tissu particulièrement riche en récepteur κ . On estime qu'ils représentent plus de 60% de la totalité des récepteurs opiacés de ce tissu (WERLING, 1985). La

population des récepteurs opiacés du cervelet serait constituée de 80-90% de récepteurs de type κ (SIMON 91). Les cerveaux de lapins et de rats, avec moins de 20% de la composition totale en récepteurs opiacés, sont plutôt pauvres en récepteurs κ (WERLING, 1985).

Un analogue du $\text{NH}_2\text{-ICI}$, dont la fonction phényl est para-substituée par du Cl (Cl-ICI), a provoqué le déplacement du $^{125}\text{I-ICI}$. Ce déplacement se fit sur plus de 4 unités logarithmiques avec un IC_{50} se chiffrant entre 2-3 nM suggérant une interaction multiréceptorielle par le Cl-ICI . Les expériences de saturations faites avec le $^{125}\text{I-ICI}$ démontrèrent aussi une interaction à une population hétérogène de récepteurs. Cette population se chiffre entre 175-200 fmol/mg de prot. dont environ 25% est composé de récepteurs à haute affinité pour le I-ICI ($\text{Kd} \approx 0.5$ nM) et le 75% restant de sites à basse affinité ($\text{Kd} \approx 3$ nM). WERLING et coll. estimèrent la population de récepteurs κ du cortex cervical de cobaye à 102 pmol/mg prot. La différence que nous observons entre nos résultats et ceux de WERLING (≈ 100 fmol/mg prot.) peut s'expliquer par la présence du cervelet, un tissu très riche en récepteur κ , dans notre préparation membranaire. L'observation de deux sites (haute et basse affinité) peut n'être que le résultat d'une variation de l'état de couplage du récepteur κ à ses effecteurs membranaires (eg. protéine G). Le ICI est un agoniste et est sans doute sensible au niveau de couplage de ses récepteurs. Le Kd moyen du I-ICI se chiffre à 2.4 nM et est comparable à l' IC_{50} du Cl-ICI . Le naloxone a aussi déplacé le $^{125}\text{I-ICI}$ mais avec un IC_{50} plus faible: 10-15 nM. Nous avons procédé à des essais de liaisons du $^{125}\text{I-ICI}$ sur des préparations membranaires de cerveaux de lapin et de rats et nous n'avons observé aucun déplacement significatif du radioligand

par le Cl-ICI (résultats non-montrés). Puisque les cerveaux de rats et de lapins sont riches en récepteurs $\mu+\delta$ et plutôt pauvres en récepteur κ , il est probable que la sélectivité du ^{125}I -ICI et du Cl-ICI envers ce dernier type de récepteurs soit responsable de l'absence de signal.

Iodation de la $[\text{NO}_2\text{-Phe}^5]\text{BK}$ ($\text{NO}_2\text{-BK}$) par la réaction de Gattermann/Sandmeyer et essais de liaison du radioligand obtenu.

Nous avons procédé à l'iodation de la BK de façon à obtenir un radioligand de plus haute radioactivité spécifique que la BK tritiée ($^3\text{H-BK}$). Nous avons effectué nos essais de liaisons sur des membranes d'iléon de cobaye, une préparation riche en récepteurs B_2 (RHALEB, et coll., 1990). Nous avons introduit préférentiellement l'iode sur le résidu Phe en position 5 plutôt que sur le résidu Phe en position 8 de façon à minimiser les risques d'altération de l'activité biologique de la BK. La portion C-terminale de ce décapeptide est essentielle à l'expression de la réponse biologique (REGOLI, 1983). Lors de nos essais, la $^{125}\text{I-BK}$ se lia aux membranes d'iléon de cobaye avec une plus grande affinité que la $^3\text{H-BK}$ (LIEBMANN, 1993). Des expériences de saturations montrèrent que la $^{25}\text{I-BK}$ se fixe à deux sites: un à haute affinité (K_H , $\text{Kd}=0.3 \text{ pM}$ et $\text{Bmax}=80 \text{ fmol/mg prot.}$) et l'autre à basse affinité (K_L , $\text{Kd}=1.1 \text{ nM}$ et $\text{Bmax}=245 \text{ fmol/mg prot.}$). Ces valeurs concordent avec celles obtenues par MANNING et coll. (1986). Il démontre l'existence de deux récepteurs dont les Kd du traceur utilisé ($^3\text{H-BK}$) se chiffrent à 13 pM et 0.9 nM . RANSOM et coll. (1992) ont utilisé le même système que Manning mais utilisèrent une température de 25°C plutôt que de 4°C . Ils ne trouvèrent qu'un seul site se chiffrant à $244 \text{ fmol/mg prot.}$ où la $^3\text{H-BK}$ exprimait un Kd de 16 pM . A l'aide d'un analogue

de la BK radioiodée sur un résidu Tyr en position 8 de la BK [^{125}I -Tyr⁸]BK, TOUSIGNANT et coll. (1991) identifièrent un seul site de liaison se chiffrant à 58 fmol/mg prot. avec un Kd de 1600 pM.

Le déplacement du ^{125}I -BK par le I-BK fut biphasique, la proportion des deux sites et leurs Kd respectifs étant semblables à ceux évalués lors des études de saturations faites avec le ^{125}I -BK. Le précurseur nitro (NO₂-BK) déplaça le ^{125}I -BK d'une manière monophasique avec une affinité relative de 400 pM. La BK déplaça la ^{125}I -BK d'une façon biphasique se liant un nombre de sites identiques à ceux interagissant avec la I-BK. Les IC₅₀ se chiffrèrent dans ce cas à 17 et 375 pM. Ainsi, la I-BK démontre une affinité accrue envers le site K_H et une affinité réduite envers le K_L comparativement à la BK native. La [des-Arg]⁹BK démontra une faible activité, déplaçant la ^{125}I -BK avec un IC₅₀ de 10 μM prouvant que les récepteurs K_H et K_L ne sont pas de type B₁.

La ^{125}I -BK nous a permis de confirmer l'existence de deux sites de liaison distincts pour la BK dans le muscle lisse de l'iléon de cobaye. Le nouveau traceur montre une affinité accrue (pM) et une sélectivité envers un site à haute affinité (B_H). Ce radioligand pourrait s'avérer très utile pour la caractérisation du site B_H puisqu'il co-existe avec un récepteur dont l'affinité est beaucoup plus basse (B_L). Le site B_L est probablement le récepteur B₂. Il est à noter que le site B_H a été décrit chez le rat (LIEBMANN, 1990) et dans l'utérus bovin (LEEB-LUNBERG, 1990) où il active des protéines G. (LIEBMANN, 1990 et 1991). Nous avons noté que la I-BK et la NO₂-BK agissent toutes deux comme agonistes sur l'iléon de cobaye. Elles suscitent

une contraction de même intensité que celle provoquée par la BK mais avec une puissance (pD_2) 10 fois moindre.

Etude scintigraphique de la biodistribution chez le lapin des composés marqués au ^{131}I par la réaction de Gattermann/Sandmeyer.

Nous avons entrepris cette étude à titre exploratoire. Nous voulions déterminer si nos composés pouvaient se révéler d'éventuels traceurs lors d'expériences *in vivo*. Rappelons qu'un traceur iodé se doit d'être résistant à la désiodination. La désiodination est un mécanisme par lequel l'iode organique, lié sur des résidus phénoliques, est enzymatiquement éliminé du noyau aromatique pour être capté dans la thyroïde. L'iode est alors disponible pour être réintroduit lors de la biosynthèse des hormones thyroïdiennes. Nous avons choisi la scintigraphie comme méthode d'analyse étant donné l'existence d'une infrastructure permettant sa pratique au sein de la faculté. La scintigraphie est une technique d'imagerie nucléaire. Divers appareils existent pour capter, *in vivo*, l'image d'une source radioactive. Les principaux sont le scintigraphe à balayage et la caméra à scintillation. Nous avons utilisé une caméra à scintillation. Ce type d'appareil peut être comparé à un appareil photographique dans lequel le rôle de l'objectif est tenu par une grille collimatrice (collimateur). L'enregistrement est réalisé par un dispositif complexe comportant: un scintillateur (cristal de NaI) d'environ 40 cm de diamètre, des photomultiplicateurs localisant les scintillations à l'intérieur du cristal et un dispositif électronique permettant d'enregistrer et de quantifier les scintillations. Les images numérisées

obtenues par la scintigraphie sont liées à la concentration d'un produit radioactif. Puisque la distribution in vivo d'un radioligand s'effectue via des mécanismes physiologiques (barrières, transporteurs, récepteurs, etc.), les scintigrammes présentent donc une signification **fonctionnelle** (physiologique). Par comparaison, les techniques radiologiques produisent des images résultant de la différence d'opacité des tissus aux rayons X. Elles ont un caractère plutôt **morphologique**.

Peu d'études scintigraphiques concernant la biodistribution des hormones peptidiques et non-peptidiques sont rapportées dans la littérature. Ceci est surtout dû à l'impossibilité d'introduire de façon simple et stable un isotope adéquat pour la scintigraphie. Notons que les isotopes doivent émettre dans une zone s'étendant de 80 à 270 keV environ (DUTREIX et coll., 1980). Le ^{99m}Tc et le ^{131}I sont des isotopes tout-à-fait adéquats pour la scintigraphie. La chimie du Tc n'est pas intéressante pour le marquage des hormones, parcequ'on doit l'introduire avec des chélateurs volumineux. En revanche, celle de l'iode l'est beaucoup plus! Toutefois, la déshalogénéation rapide des radioligands iodés constitue, dans biens des cas, un inconvénient (SARGENT et coll., 1978).

Choix des conditions expérimentales:

Puisque cette étude n'est qu'exploratoire, nous avons décidé d'étudier un nombre limité de composés: 3 peptides et 1 composé non-peptidique. Le I-Ang, la I-BK, le I-DPDP et le I-ICI furent retenus car ils ont démontré les meilleures propriétés de liaison lors des essais in vitro. Le lapin fut choisi comme récipient étant donné sa taille optimale vis-à-vis la taille du collimateur. Les rats ont des organes trop petits

pour une bonne distinction scintigraphique et les chiens sont généralement trop gros pour avoir une vue globale de l'animal.

Les paramètres d'administration furent aussi limités. Toutes les injections se sont faites par une veine marginale de l'oreille. Nous avons dû, pour des raisons pratiques, anesthésier les lapins. Afin de limiter l'impact physiologique de l'anesthésie, nous avons minimisé les doses d'anesthésique de façon en garder l'animal à la frontière sédation-anesthésie (perte du réflexe oculaire). Nous n'avons, en aucun temps, utilisé d'inhibiteurs enzymatiques (eg. captopril pour la BK). Nous avons administré des doses de radioligands inférieures à 250 μCi (100 à 200 μCi). Nous récoltions environ 1 mCi de radioligand à partir de 2.5 mCi de ^{131}I . Ce mCi de radioligand était finalement aliquoté en 4 doses d'environ 200 μCi . Si un lapin moyen (2.5 kg) a un volume sanguin d'approximativement 150 ml, et qu'une dose de 200 μCi d'un radioligand monoiodé au ^{131}I ($\approx 16000 \text{ Ci/mmol}$; KALLEE, 1973) est restreinte à ce volume de distribution, la concentration sanguine approximative de ce radioligand sera au plus de 0.1 nM. Cette valeur est environ 10 fois inférieure au K_d moyen ($\approx 1 \text{ nM}$) des radioligands iodés décrits dans la présente étude. Il serait important dans la poursuite du projet d'utiliser des doses de radioligands nettement supérieures, c'est-à-dire au moins équivalent au K_d du radioligand, afin de favoriser l'association de ces dernier à leurs récepteurs. Dans les conditions prévalentes, l'emploi de doses supérieures à 1 mCi permettrait, évidemment, l'obtention de bien meilleures images.

La résolution d'un scintigramme dépend de la quantité (activité) du radioliand

administré. Ainsi pour obtenir des images de résolution adéquate, nous avons dû cumuler entre 25-40,000 comptes/pixel. Ce niveau de compte dicte le temps d'enregistrement. Les temps d'enregistrements variaient en moyenne de 5 à 10 minutes pour les premières images (5 min. à 6 heures p.i.) et de 15 à 30 minutes pour les dernières images (12 heures p.i. et plus). Tous les enregistrements furent faits en latéral (côté droit du lapin exposé).

Localisation des repères anatomiques.

Les principaux repères anatomiques servant à l'identification des organes pour les analyses d'image sont la thyroïde, les os, le coeur, le foie, les reins et le pool sanguin. La thyroïde est facilement identifiable par injection de Na^{131}I . Les os, le coeur, le foie et les reins sont identifiables par administration de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -pyrophosphate. Le foie, le coeur, les reins et le pool sanguin dans son ensemble est aussi localisé par injection de globules rouges marqués au $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Cette étape expérimentale nous a permis de prendre conscience d'une première limite de la scintigraphie: son manque de perspective. En effet, les scintigrammes sont des images bidimensionnelles. Par exemple si on localise un site d'intérêt au coeur sur une vue en latérale, nous ne pouvons affirmer si la zone active est dans la partie droite ou la partie gauche du coeur. Le marquage des os représente un exemple typique de cet état. Le marquage des os au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ montre un point très actif dans une zone où se situe les clavicules: c'est le résultat du marquage des clavicules, d'une partie du sternum et des têtes des humérus. Pour une idée très exacte des sites radioactifs des plans latéraux et de face s'imposent.

Inertie des désiodases face au ^{131}I -Phe.

La comparaison des courbes de mobilisation thyroïdienne du ^{131}I -Phe démontrent que, contrairement à la ^{131}I -Tyr, la ^{131}I -Phe ne subit pas de désiodation significative et ce même après 24 heures. La courbe de mobilisation thyroïdienne après injection de ^{131}I -Tyr est pratiquement identique à celle provoquée par l'administration de Na^{131}I . La ^{131}I -Tyr est donc rapidement et efficacement désiodée. Les niveaux de captation d'iode par la thyroïde mesurés (15-20% en 24 hres) sont équivalents à ceux généralement cités dans la littérature (CEDERQUIST et coll., 1975). La courbe de mobilisation thyroïdienne suite à l'administration de ^{131}I -Phe est identique à la courbe décrivant la concentration sanguine du produit. L'analyse du contenu radioactif urinaire suivant l'administration du ^{131}I -Phe ne démontre pas de trace de ^{131}I libre comme c'est le cas avec la ^{131}I -Tyr. Ce sont, à notre avis, des indices prouvant qu'aucun métabolisme significatif de l'iode n'intervient sur un résidu I-Phe. Cette phase expérimentale nous permet d'apprécier l'aspect non-invasif de la scintigraphie concernant la constitution des courbes d'accumulation ou de clairance chez divers organes. Aucun prélèvement de sang ni d'organe n'est nécessaire pour l'obtention de tels résultats.

Analyse des sites de biodistribution des radioligands marqués.

Les composés bioactifs sont rapidement métabolisés dans l'organisme. Citons la demi-vie plasmatique de la BK se chiffrant à environ 15 secondes (RYAN, 1982). Les peptides subissent une hydrolyse enzymatique et les métabolites résiduels passent par diverses étapes de biotransformation par les enzymes hépatiques (eg. hydroxylation, conjugaison). Les composés non-peptidiques subissent des

transformations par les enzymes hépatiques eux aussi. Ainsi, les images prises à 5 min. sont celles où nous sommes plus en mesure de vérifier l'évolution d'un composé dans son état natif. Les images prises à des intervalles plus longs démontrent probablement le comportement des métabolites du composé injecté. Pour minimiser la biotransformation à court terme des composés, nous avons choisi dans la mesure du possible, des analogues modifiés offrant une résistance métabolique plus élevée que le composé parent dont ils dérivent. Ainsi l'analogue de l'Ang porte en position 1 un résidu sarcosine (Sar ou N-méthyl-glycine). Ce résidu confère à l'Ang une résistance accrue aux aminopeptidases (BUMPUS, 1977). Le I-DPDP est un peptide cyclique. La présence d'un cycle et de l'acide aminé D-penicillamine (D-Pen), confère à ce peptide une plus grande stabilité chimique et physiologique. Le I-ICI, un composé non-peptidique, est métaboliquement résistant aux peptidases pancréatiques. Les passages hépatiques sont sans doute, les étapes risquant le plus de modifier sa structure. Seule la I-BK n'offre pas, à priori, de résistance métabolique puisqu'elle n'a que l'atome d'iode comme modification structurale.

L'administration de ^{131}I -Ang a provoqué en 5 minutes une activité intense dans le pool sanguin et en particulier au cœur, au foie, et aux reins. Ces organes sont des cibles reconnues pour l'Ang. Le pré-traitement avec un compétiteur non-peptidique et sélectif pour les récepteurs AT_1 (L-158,809) semble avoir atténué l'activité dans chacun des organes mentionnés auparavant, suggérant une présence spécifique du traceur.

L'injection de ^{131}I -BK a engendré après 5 minutes une activité notoire dans

le pool sanguin et en particulier aux poumons, au coeur et au foie. La présence d'un excès de BK non-marquée ne semble pas avoir significativement modifié la distribution du traceur ou de ses métabolites pour ce laps de temps. Une différence plus significative de la distribution en présence ou en absence de compétiteur est notée après 1 heure p.i. La présence d'un excès de BK non-marquée (ou de ses métabolites) semble avoir atténué la présence de la ^{131}I -BK (ou de ses métabolites) surtout au niveau des zones intestinales et hépatiques. Nous pouvons suggérer une présence spécifique de la BK ou de ses métabolites à ces endroits. L'intestin (iléon, duodénum), le coeur et les vaisseaux sanguins sont des sites d'action connus de la BK.

L'administration du composé sélectif pour les récepteurs opiacés δ , le ^{131}I -DPDP, a suscité à 5 min. p.i. une activité intense au foie, aux reins, à la vessie ou à des structures qui lui sont connexes. Un excès de naloxone semble avoir atténué l'activité du traceur à la vessie ou à ses structures connexes confinant le ^{131}I -DPDP dans une zone localisée du foie où anatomiquement devrait se situer la vésicule biliaire. Les récepteurs δ ont été identifiés dans le plexus mésentérique du système digestif, au niveau des sphincters de la vésicule biliaire et dans l'intestin (iléon). Ils sont aussi bien caractérisés dans les canaux déférents. Il se peut que les structures connexes à la vessie où l'activité du ^{131}I -DPDP est atténuée par le naloxone soient en fait les canaux déférents.

L'injection du composé sélectif pour les récepteurs κ , le ^{131}I -ICI, a provoqué à 5 min p.i. une activité localisée au niveau du foie, des intestins et des reins. La

présence d'un excès de naloxone semble avoir atténué la présence du ^{131}I -ICI dans la partie antérieure de l'intestin et dans les reins, suggérant une spécificité de localisation du ^{131}I -ICI à ces endroits. Le naloxone n'a cependant pas fait varier significativement le contenu hépatique pendant ce laps de temps. Les récepteurs κ sont la cible des dynorphines. Les sites majeurs de distribution des récepteurs κ sont: le cervelet, le rein et les sphincters de la vésicule biliaire et de la vessie (OLSON et al., 1981).

Calcul de la présence spécifique d'un radioligand par déplacement avec un compétiteur non-radioactif.

Même si un excès de compétiteur non-radioactif semble faire varier les niveaux de distribution d'un traceur chez divers organes, il faut être en mesure de quantifier ce déplacement. Divers groupes ont suggéré une méthode pour mesurer in vivo la spécificité de liaison d'un radioligand à un organe cible. La méthode consiste à établir le rapport du contenu d'un organe cible sur celui d'un compartiment connexe non-spécifique au traceur où ce dernier serait chassé lors du déplacement (BYLUND et coll., 1977). Ces derniers suggèrent le sang comme compartiment de "chasse". Une diminution du rapport [organe]/[sang] par l'addition d'un excès de compétiteur indique un déplacement du radioligand de l'organe cible vers le compartiment de chasse. Cette méthode n'est pas applicable en ce qui concerne notre étude. L'Ang et la BK agissent toutes deux au niveau des vaisseaux sanguins. Le DPDP et le ICI ont des concentrations plasmatiques très basses rendant peu fiables les valeurs obtenues par un tel rapport.

Pour vérifier la spécificité de la localisation de nos ligands dans un organe, nous avons mesuré l'atténuation du niveau des comptes initiaux provoqué par un excès de compétiteur non-marqué. Par exemple si le contenu d'un organe représente 10% de la dose initiale d'un radioligand et qu'en présence d'un excès de compétiteur le contenu de cet organe ne représente plus que 6%, nous suggérons qu'il y a eu atténuation de 40% de la présence du radioligand. Par conséquent, 40% de l'activité du radioligand dans l'organe étudié était probablement spécifique. Pour faciliter l'interprétation des résultats nous avons relativisé le contenu initial de chaque organe d'intérêt sur une base de 100% de comptes initiaux enregistrés dans l'organe. Lors de la poursuite du projet, on pourrait valider notre méthode de quantification en excisant les organes cibles et en évaluant leur contenu radioactif et/ou en autoradiographiant ces mêmes organes. Pour chaque radioligand, nous avons donc mesuré l'atténuation provoquée par compétition dans le foie, le rein, le poumon, l'intestin et la vésicule biliaire. Voici en résumé les résultats les plus indicatifs.

Nous avons évalué que le L-158,809 pouvait provoquer à 5 min. p.i. une atténuation de la présence de ^{131}I -Ang (ou de ses métabolites) se chiffrant à 25% pour le foie, à 50% dans les poumons et à environ 20% aux reins. Les niveaux d'atténuation de la présence de ^{131}I -BK (ou de ses métabolites) par un excès de BK sont très faibles et peu significatives (10-20%) dans les reins et l'intestin. Par contre, un excès de naloxone semble après 5 min. p.i. avoir significativement abaissé les niveaux de ^{131}I -DPDP (ou de ses métabolites) dans le foie ($\approx 35\%$) et dans la vésicule biliaire ($\approx 60\%$). Les niveaux de ^{131}I -ICI n'ont été que très peu abaissés à 5 min. p.i. par le naloxone. On chiffre une atténuation maximale de l'ordre de 10% dans le foie

et dans l'intestin.

Nous pensons que la façon dont est induite la compétition joue un rôle important dans l'observation des déplacements des radioligands ou de leurs métabolites. Le pré-traitement avec le compétiteur au moins 2 minutes avant l'administration du radioligand serait souhaitable. Un pré-traitement n'a été fait seulement que dans l'étude impliquant le ^{131}I -Ang. Les autres compétitions ont été induites par co-injection des radioligands et des compétiteurs.

Accumulations et clairances hépatiques, rénales et intestinales des radioligands et de leurs métabolites.

Cette partie de l'étude nous a permis de constater que les composés marqués étaient rapidement mobilisés par le foie. Le maximum était obtenu à la première lecture, soit celle faite vers 5 minute p.i. Cependant les rythmes auxquels se font les clairances diffèrent. La clairance hépatique se fait avec un $t_{1/2}$ d'environ 5 heures pour la radioactivité issue du ^{131}I -Ang, du ^{131}I -DPDP et du ^{131}I -ICI alors que le $t_{1/2}$ de la radioactivité issue de la ^{131}I -BK est de 12 heures. La clairance intestinale se produit avec des $t_{1/2}$ de 6 heures pour le ^{131}I -Ang, de 18 heures pour la ^{131}I -BK et de 21 heures pour le ^{131}I -ICI. Les clairances rénales du ^{131}I -Ang et de la ^{131}I -BK sont caractérisées par un $t_{1/2}$ d'environ 18-20 heures. Fait intéressant à noter, les courbes d'excrétion hépatiques et intestinales du ^{131}I -DPDP sont asymptotiques. Ceci est probablement produit par une mobilisation du ligand ou de ses métabolites dans le cycle entéro-hépatique.

Analyse du contenu radioactif urinaire suite à l'administration des radioligands.

L'urine récoltée 1 heure suivant l'administration de ^{131}I -Ang, de ^{131}I -BK ou de ^{131}I -DPDP, contient des composés éluant avec la même rétention que les radioligands administrés préalablement. Il s'agit probablement de ces mêmes radioligands excrétés par filtration glomérulaire. En effet, des polypeptides pesant jusqu'à 6000 Da peuvent franchir librement la barrière que constituent les glomérules rénaux (GUYTON, 1991). Par exemple, on mesure l'excrétion urinaire des angiotensines (I et II) lors de la caractérisation de divers diurétiques (BOER et al., 1989). On mesure aussi le contenu urinaire en kinines dans certains modèles servant à l'étude des mécanismes de l'hypertension (YAMASU et al., 1989). Dans tous les cas, des métabolites plus hydrophiles, résultant probablement de l'hydrolyse (peptides) ou des mécanismes d'hydroxylation et/ou de conjugaison (peptides et non-peptides), apparaissent dans l'urine dès 3 heures suivant l'administration des radioligands. La concentration relative de ces métabolites hydrophiles augmente en fonction du temps.

CONCLUSION et PERSPECTIVES

La réaction de Gatterman/Sandmeyer se veut une méthode alternative de radioiodation des peptides ou de composés non-peptidiques comportant dans leur structure une fonction de type aniline. Elle nous a permis d'ioder 9 nouveaux ligands avec un rendement moyen d'environ 40-50%. Nous avons produits de cette façon deux analogues de l'Ang (I-Ang et I-PD123177), 5 ligands des récepteurs opiacés (I-ENK, I-DPDP, I-DALDA, I-YaFF et I-ICI), 1 analogue de la VP et un de la BK. Nous avons ainsi produit des radioligands dans une famille de composés où perdurait une lacune de traceurs sélectifs à haute radioactivité spécifique: les enképhalines. Parmi ces composés, le I-ICI pourrait s'avérer un radiotraceur très utile dans l'étude des mécanismes des psychoses de type maniaco-dépressive. Ce composé possède en effet une forte activité dysphorique (JAMES, 1992). Tous les radioligands démontrent une affinité par essai de liaison (K_d) de l'ordre du nM. Nous avons noté que les radioligands issus de composé à priori sélectifs, gardent dans l'ensemble une bonne sélectivité. L'iodation de la bradykinine nous a permis de confirmer que les radioligand iodés par la réaction de Gatterman/Sandmeyer pouvaient conserver une excellente activité biologique. Nous avons synthétisé un nouveau radioligand photoactivable de l'Ang: le ^{125}I -Bpa-Ang. Ce ligand a démontré d'excellentes propriétés de liaison et d'incorporation dans des études de photomarquage.

Les essais de liaison des composés iodés sur des préparations membranaires de cerveaux entiers de rats, de lapins ou de cobayes devraient être poursuivis en disséquant certaines structures importantes et facilement isolables du cerveau. Ainsi

le cortex frontal, le striatum (noyau caudé et putamen) ainsi que le thalamus pourraient s'avérer des régions extrêmement intéressantes à caractériser à l'aide des composés radioiodés, en particulier ceux dérivant des enképhalines. Il existe en effet une coexistence des systèmes enképhalinergiques avec de nombreux axes dopaminergiques centraux. Il serait par exemple intéressant de caractériser la modulation des récepteurs opiacés par la dopamine afin de pouvoir étudier leur implication éventuelle dans certaines neuropathologie associables aux axes dopaminergiques (Parkinsonisme, Chorée de Huntington, etc.). De telles études pourraient aussi bien s'effectuer par essais de liaison classiques que par des techniques autoradiographiques.

Nous avons, en dernier lieu, procédé à une étude exploratoire visant à déterminer si nos radioligands marqués via la réaction de Gatterman/Sandmeyer pouvaient devenir des traceurs adéquats lors d'expériences de localisation in vivo. Par étude scintigraphique nous avons prouvé que les peptides iodés sur un résidu Phe étaient inertes à l'action des désiodases et ce jusqu'à 24 heures suivant l'administration des radioligands. Il est possible de visualiser les sites de distribution des radioligands et/ou de leurs métabolites. Des courbes de distribution et de clairance par les divers organes impliqués dans la biotransformation et l'élimination des composés bioactifs furent faites de façon non-invasive. Des mesures sommaires de la spécificité de la distribution des radioligand ont été produites. Cependant il reste à optimiser certaines conditions afin d'obtenir des valeurs plus significatives. Une augmentation de la dose (radioactivité) des radioligands permettrait des temps d'enregistrement plus courts et minimiserait la biotransformation des traceurs. Un

pré-traitement de quelques heures avec un excès de compétiteurs non-peptidiques favoriseraient une meilleure évaluation de la spécificité de la distribution des radioligands.

Annexe 1a. Calcul de la constante d'affinité du ^{125}I -Ang à partir des données obtenues d'une expérience de saturation.

référence: courbe de Scatchard, figure 15

données: B_{max} : 0.6 pmol/mg prot.

B/F : 0.14

quantité de protéines utilisée par tube: 50 μg

volume des essais: 200 μl

$$\text{pente} = \frac{\Delta Y}{\Delta X} = \frac{-1}{K_d} = \frac{0.14}{0.6 \text{ pmol/mg prot.}} = 0.233 \text{ mg prot./pmol}$$

$$K_d = 4.28 \text{ pmol/mg prot.} \quad \text{or } 50 \text{ } \mu\text{g de protéines ont été utilisés dans un volume de } 200 \text{ } \mu\text{l.}$$

$$4.28 \frac{\text{pmol}}{\text{mg prot.}} \times \frac{50}{200} \frac{\mu\text{g prot.}}{\mu\text{l}}$$

$$1.07 \times 10^{-9} \text{ mol/l}$$

$$K_d = 1.07 \text{ nM}$$

Annexe 1b. Calcul de la constante d'affinité du ^{125}I -VP à partir des données obtenues d'une expérience de déplacement.

référence: courbe de Scatchard, figure 17

données: B_{max} : 0.9 pmol/mg prot.

B/F : 0.47

quantité de protéines utilisée par tube: 100 μg

volume des essais: 200 μl

$$\text{pente} = \frac{\Delta Y}{\Delta X} = \frac{-1}{K_d} = \frac{0.47}{0.9 \text{ pmol/mg prot.}} = 0.522 \text{ mg prot./pmol}$$

$$K_d = 1.915 \text{ pmol/mg prot.}$$

or 100 μg de protéines
ont été utilisés dans un
volume de 200 μl .

$$1.915 \frac{\text{pmol}}{\text{mg prot.}} \times \frac{100}{200} \frac{\mu\text{g prot.}}{\mu\text{l}}$$

$$9.58 \times 10^{-10} \text{ mol/l}$$

$$K_d = 0.96 \text{ nM}$$

Annexe 1c. Calcul des constantes d'affinité du ^{125}I -Enk à partir des données obtenues d'une expérience de déplacement.

référence: courbe de Scatchard, figure 19

données: site 1: Bmax: 25 fmol/mg prot. site 2: Bmax: 100 fmol/mg prot.
B/F: 0.085 B/F: 0.05

quantité de protéines utilisée par tube: 1 mg

volume des essais: 400 μl

$$\text{site 1} \quad \text{pente} = \frac{\Delta Y}{\Delta X} = \frac{-1}{K_d} = \frac{0.085}{25 \text{ fmol/mg prot.}} = 0.0034 \text{ mg prot./fmol}$$

$K_d = 294 \text{ fmol/mg prot.}$, or 1 mg de protéines a été utilisé dans un volume de 400 μl .

$$294 \frac{\text{fmol}}{\text{mg prot.}} \times \frac{1}{400} \frac{\text{mg prot.}}{\mu\text{l}}$$

$$7.35 \times 10^{-10} \text{ mol/l}$$

$$K_d = 0.73 \text{ nM (site à haute affinité)}$$

$$\text{site 2} \quad \text{pente} = \frac{\Delta Y}{\Delta X} = \frac{-1}{K_d} = \frac{0.05}{100 \text{ fmol/mg prot.}} = 0.0005 \text{ mg prot./pmol}$$

$K_d = 2000 \text{ fmol/mg prot.}$, or 1 mg de protéines a été utilisé dans un volume de 400 μl .

$$2000 \frac{\text{fmol}}{\text{mg prot.}} \times \frac{1}{400} \frac{\text{mg prot.}}{\mu\text{l}}$$

$$5 \times 10^{-9} \text{ mol/l}$$

$$K_d = 5 \text{ nM (site à basse affinité)}$$

Annexe 1d. Calcul de la constante d'affinité du ^{125}I -DPDP à partir des données obtenues d'une expérience de déplacement

référence: courbe de Scatchard, figure 21

données: B_{max} : 95 fmol/mg prot.

B/F : 0.075

quantité de protéines utilisée par tube: 500 μg

volume des essais: 400 μl

$$\text{pente} = \frac{\Delta Y}{\Delta X} = \frac{-1}{K_d} = \frac{0.075}{95 \text{ fmol/mg prot.}} = 0.000789 \text{ mg prot./fmol}$$

$K_d = 1266 \text{ fmol/mg prot.}$ or 500 μg de protéines ont été utilisés dans un volume de 400 μl .

$$1266 \frac{\text{fmol}}{\text{mg prot.}} \times \frac{500}{400} \frac{\mu\text{g prot.}}{\mu\text{l}}$$

$$1.6 \times 10^{-9} \text{ mol/l}$$

$$K_d = 1.6 \text{ nM}$$

Annexe 1e. Calcul de la constante d'affinité du ^{125}I -DALDA à partir des données obtenues d'une expérience de déplacement.

référence: courbe de Scatchard, figure 23

données: Bmax: 125 fmol/mg prot.

B/F: 0.022

quantité de protéines utilisée par tube: 500 μg

volume des essais: 400 μl

$$\text{pente} = \frac{\Delta Y}{\Delta X} = \frac{-1}{K_d} = \frac{0.022}{125 \text{ fmol/mg prot.}} = 0.000176 \text{ mg prot./fmol}$$

$K_d = 5681 \text{ fmol/mg prot.}$ or 500 μg de protéines ont été utilisés dans un volume de 200 μl .

$$5681 \frac{\text{fmol}}{\text{mg prot.}} \times \frac{500}{400} \frac{\mu\text{g prot.}}{\mu\text{l}}$$

$$7.10 \times 10^{-9} \text{ mol/l}$$

$$K_d = 7.10 \text{ nM}$$

Annexe 1f. Calcul de la constante d'affinité du ^{125}I -YaFF à partir des données obtenues d'une expérience de déplacement.

référence: courbe de Scatchard, figure 26

données: B_{max} : 105 fmol/mg prot.

B/F : 0.023

quantité de protéines utilisée par tube: 750 μg

volume des essais: 400 μl

$$\text{pente} = \frac{\Delta Y}{\Delta X} = \frac{-1}{K_d} = \frac{0.020}{105 \text{ fmol/mg prot.}} = 0.00019 \text{ mg prot./fmol}$$

$K_d = 5249 \text{ fmol/mg prot.}$ or 750 μg de protéines ont été utilisés dans un volume de 400 μl .

$$5249 \frac{\text{fmol}}{\text{mg prot.}} \times \frac{500}{400} \frac{\mu\text{g prot.}}{\mu\text{l}}$$

$$1.01 \times 10^{-8} \text{ mol/l}$$

$$K_d = 10.1 \text{ nM}$$

Annexe 1g. Calcul des constantes d'affinité du ^{125}I -ICI à partir des données obtenues d'une expérience de saturation.

référence: courbe de Scatchard, figure 29

données: site 1: Bmax: 45 fmol/mg prot. site 2: Bmax: 142 fmol/mg prot.
B/F: 0.122 B/F: 0.06

quantité de protéines utilisée par tube: 500 μg

volume des essais: 400 μl

$$\text{site 1} \quad \text{pente} = \frac{\Delta Y}{\Delta X} = \frac{-1}{K_d} = \frac{0.122}{45 \text{ fmol/mg prot.}} = 0.0027 \text{ mg prot./fmol}$$

$K_d = 369 \text{ fmol/mg prot.}$, or 500 μg de protéines a été utilisé dans un volume de 400 μl .

$$369 \frac{\text{fmol}}{\text{mg prot.}} \times \frac{500 \mu\text{g prot.}}{400 \mu\text{l}}$$

$$4.61 \times 10^{-10} \text{ mol/l}$$

$K_d = 0.46 \text{ nM}$ (site à haute affinité)

$$\text{site 2} \quad \text{pente} = \frac{\Delta Y}{\Delta X} = \frac{-1}{K_d} = \frac{0.06}{142 \text{ fmol/mg prot.}} = 0.00042 \text{ mg prot./pmol}$$

$K_d = 2366 \text{ fmol/mg prot.}$, or 500 μg de protéines a été utilisé dans un volume de 400 μl .

$$2366 \frac{\text{fmol}}{\text{mg prot.}} \times \frac{500 \mu\text{g prot.}}{400 \mu\text{l}}$$

$$2.96 \times 10^{-9} \text{ mol/l}$$

$K_d = 2.96 \text{ nM}$ (site à basse affinité)

Annexe 1h. Calcul des constantes d'affinité du naloxone à partir des données obtenues d'une expérience de saturation.

référence: courbe de Scatchard, figure 30

données: site 1: Bmax: 50 fmol/mg prot. site 2: Bmax: 100 fmol/mg prot.
B/F: 0.13 B/F: 0.03

quantité de protéines utilisée par tube: 500 µg

volume des essais: 400 µl

$$\text{site 1} \quad \text{pente} = \frac{\Delta Y}{\Delta X} = \frac{-1}{K_d} = \frac{0.13}{50 \text{ fmol/mg prot.}} = 0.0026 \text{ mg prot./fmol}$$

$K_d = 385 \text{ fmol/mg prot.},$ or 500 µg de protéines a été utilisé dans un volume de 400 µl.

$$385 \frac{\text{fmol}}{\text{mg prot.}} \times \frac{500 \text{ µg prot.}}{400 \text{ µl}}$$

$$4.81 \times 10^{-10} \text{ mol/l}$$

$K_d = 0.48 \text{ nM}$ (site à haute affinité)

$$\text{site 2} \quad \text{pente} = \frac{\Delta Y}{\Delta X} = \frac{-1}{K_d} = \frac{0.03}{100 \text{ fmol/mg prot.}} = 0.0003 \text{ mg prot./pmol}$$

$K_d = 3333 \text{ fmol/mg prot.},$ or 500 µg de protéines a été utilisé dans un volume de 400 µl.

$$3333 \frac{\text{fmol}}{\text{mg prot.}} \times \frac{500 \text{ µg prot.}}{400 \text{ µl}}$$

$$4.16 \times 10^{-9} \text{ mol/l}$$

$K_d = 4.16 \text{ nM}$ (site à basse affinité)

Annexe 1i. Calcul de la constante d'affinité du ^{125}I -Bpa-Ang à partir des données obtenues d'une expérience de saturation.

référence: courbe de Scatchard, figure 36

données: Bmax: 0.8 pmol/mg prot.

B/F: 0.29

quantité de protéines utilisée par tube: 50 μg

volume des essais: 200 μl

$$\text{pente} = \frac{\Delta Y}{\Delta X} = \frac{-1}{K_d} = \frac{0.29}{0.8 \text{ pmol/mg prot.}} = 0.365 \text{ mg prot./pmol}$$

$K_d = 2.76 \text{ pmol/mg prot.}$ or 50 μg de protéines ont été utilisés dans un volume de 200 μl .

$$2.76 \frac{\text{pmol}}{\text{mg prot.}} \times \frac{50}{200} \frac{\mu\text{g prot.}}{\mu\text{l}}$$

$$6.90 \times 10^{-10} \text{ mol/l}$$

$$K_d = 0.7 \text{ nM}$$

BIBLIOGRAPHIE

- Ariens,E.J. Van Rossum,J.M and Simonis,A.M. Affinity, intrinsic activity and drug interactions, *Pharmacol. Rev.* vol.9, pp.218-236 (1957)
- Ariens,J. Théories sur les récepteurs et relations entre structure et activité dans le domaine des substances cholinergiques et anti-cholinergiques. Dans *Actualités pharmacologiques*. 22^{ème} série. Ed. Cheymol,J. Boissier,J.R. Lechat,P., Masson & Compagnie, Paris, pp.261-292 (1964)
- Barbeau, D. Développement d'analogues photosensibles et fluorescents de la vasopressine et marquage par photoaffinité du récepteur V₁. Mémoire de maîtrise présenté à la Faculté de Médecine de l'Université de Shebrooke, 103 pages. (1991)
- Barlow,J., Blackburn,T.P., Costello,G.F., Janes,R., Le Count,D.J., Main,B.G., Pearce,R.J., Russell,K. and Shaw,J.S. Structure/activity studies related to 2-(3,4-dichlorophenyl)-N-methyl-N-[2-(1-pyrrolidiny)-1-substituted-ethyl]acetamides: a novel series of potent and selective k-opioid agonists. *J. Med. Chem.* vol.34 (11) pp. 3149-3158
- Bergel,F., and Stock,J.A. Cyto-active amino-acids and peptides. Part V. Derivatives of p-amino and p-mercapto-phenylalanine. *J. Amer. Chem. Soc.* pp.90-96 (1959)

Blankley,C.J. Hodges,J.C., Klutchko,S.R., Himmelsbach,R.J., Chucholowski,A., Conolly,C.J., Neergard, S.J., Van Nieuwenhuise,M.S., Sebastian,A., Quin,J., Essenburg,A. and Cohen,D.M. Synthesis and structure-activity relationships of a novel series of non-peptide angiotensin II receptor binding inhibitors specific for the AT₂ subtype. J.Med. Chem., vol.34 pp.3248-3260 (1991)

Boer,P., Koomans, H.A., Boer,W.H. et Dorhout Mees,E.J. Urinary angiotensin excretion during sodium restriction and diuretics. Nephrology, Dialysis, Transplantation. vol.4(8), pp.717-717 (1989)

Bolton,A.E. et Hunter,W.M. Labeling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to an ¹²⁵I-containing acylating agent. Application to the radioimmunoassay. Biochem. J., vol.133, pp.529-539 (1973)

Bossé,R., Gerold,H., Fischli,W., Holck,M. and Escher,E. An angiotensin with prolonged action and anti-hypertensive properties. J. Cardiovasc. Pharmacol. vol.16, pp.S50-S55 (1990)

Bossé,R., Servant,G., Zhou,L.-M., Boulay,G., Guillemette,G. and Escher,E. Sar¹-p-benzoylphenylalanine-angiotensin, a new photoaffinity probe for selective labeling of the type 2 angiotensin receptor. Regulatory Peptides, vol.44 pp.215- 223 (1993)

Bossé,R. Etude de Structure-Activité sur la position 8 de l'Angiotensine II: les

principes d'antagonisme et de longue durée d'action. Mémoire de Maîtrise. 96 pages. (1989)

Boyd,N.D., White,C.F., Cerpa,R., Kaiser,E.T. and Leeman,S.E. Photoaffinity labeling the substance P receptor using a derivative of substance P containing p-benzoylphenylalanine. Biochem. vol.30, pp.336-342 (1991)

Bumpus,F.M. Mechanisms and site of action of newer angiotensin agonists and antagonists in terms of activity and receptor. Fed. Proc. vol.36, pp.287-313 (1977)

Bylund,D.B., Charness,M.E. and Snyder,S.H. Beta-adrenergic receptor labeling in intact animals with ^{125}I -hydroxybenzylpindolol. J. Pharmacol. Exp. Ther. vol.201, pp.644-651 (1977)

Cederquist,,E., Navertsen,Y., Persson,R.B.R. and Strand,S.E., Morphological and dynamic studies of the accumulation of I-123 and Tc-99m in the thyroid. Proc. 4th Int. Symp. Nucl. Med. Karlovy Vary, Czechoslovakia (1975)

Cheng,Y. and Prussoff,W.M. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor wich causes 50% inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. Biochem. Pharmacol., vol.22, pp. 3099-3108 (1973)

Clark,M.J., Carter,B.D. and Medzihradsky,F. Selectivity of ligand binding to opioid

receptors in brain membranes from the rat, monkey and guinea pig. Eur. J. of Pharmacol. vol .148, pp.343-351 (1988)

Dam,T.-V., and Quirion,R. Ontogeny of substance P receptor binding sites in rat brain. J. Neurosc., vol.6, pp.2187-2199 (1986)

Dutreix,J. Desgrez,A., Bok,B. et Vinot,J.-M. Dans Biophysique des radiations - Utilisation biologique et médicale des radiations. 2ème édition. Masson Ed. Paris, pp.151-161 (1980)

Escher,E. A new method of iodine labeling of peptide hormones. J. Recept. Res. vol.4, pp.331-336 (1984)

Escher,E., Guillemette,G., Leukart,O. and Regoli D. Pharmacological properties of two analogues of angiotensin II containing carboranylalanine. Eur. J. Pharmacol., vol.66 pp. 267-272 (1980)

Fischmann,J., Dickey,D.F. and Fine,R. Purification and characterization of the rat liver vasopressin V₁ receptor. J. Biol. Chem. vol. 262 (29) pp. 14049- 14055. (1987)

Furchgott,R.F. and Badrakhom,S. Reactions of strips of rabbit aorta to epinephrine, isoproterenol, sodium nitrite and other drugs. J. Pharmacol. Exp. Ther., vol. 108, pp. 129-135 (1953)

Fracker,P.J. and Speck,J.C. Protein and cell iodinations with a sparingly soluble chloramine, 1,3,4,6-tetrachloro-diphenylglycoluril. Biochem. Biophys. Res. Commun., vol.80, pp.849-857 (1978)

Gatterman,L. Beilstein, vol.23, pp. 1218-1125 (1890)

Glossmann,H., Baukal,A.J. and Catt,K.J. Properties of angiotensin II receptors in the bovine and rat adrenal cortex. J. Biol. Chem., vol.249, pp.825-834 (1974)

Guillemette,G. and Escher,E. Analysis of the adrenal angiotensin II receptor with the photoaffinity labeling method. Biochemistry, vol.22, pp.5591-5596 (1983)

Guyton, A.C. Textbook of medical physiology - eight edition., Martin J. Wonsiewicz, Editeur, W.B. Saunders Inc. Philadelphia, PA. 1014 pages (1991)

Holck,M., Bossé,R., Fischli,W., Gerold,H. and Escher,E. An angiotensin II antagonist with strongly prolonged action. Biochem. Biophys. Res. Comm., vol.160 pp.1350-1356 (1989)

James,R. ICI Pharmaceuticals, Macclesfield, Cheshire, England. Communication personnelle (1992)

Jard,S. Mechanisms of action of vasopressins and vasopressins antagonists. Kidney

int. (supp.) vol.26, pp s38-42. (1986)

Kallee,E. Dans Documenta Geigy - Scientific Tables 7ème édition. K. Diem et C. Lentner, éditeurs. Ciba-Geigy Limited, Basle, Suisse. page 292 (1973)

Kauer,J.C., Erickson,S.E., Wolf,H.R. and Degrado,W,F .p-Benzoyl-l-phenyl-alanine, a new photoreactive amino acid. J. Biol. Chem. vol.261(23), pp.10696- 10700 (1986)

Knapp,R., Sharma,D.S., Toth,G., Duong,M.T., Fang,L., Bogert,C.L., Weber,S.J., Hunt,M., Davis,T.P., Wamsley,J.K., Hruby,V.J. and Yamamura,H.I. [D-Pen²,4'- ¹²⁵I-Phe⁴,D-Pen⁵]Enkephalin: a selective high affinity radioligand for delta opioid receptors with exceptional specific activity. J. Pharmacol. Exp. Ther. vol.258 (3) pp.1077-1083 (1991)

Lazco,E., and Escher,E., Synthesis of photoaffinity labeling analogues of the peptide hormone bradykinin. Helv. Chim. Acta, vol.64, pp. 621-627 (1981)

Leduc,R. Bernier,M. and Escher,E. Angiotensin analogues 1: Synthesis and incorporation of the halogenated amino acids (4'-I)phenylalanine, (3',5'-Br₂,4'-Cl)phenylalanine,(3',4',5'-Br₃)phenylalanineet(2',3',4',5',6'-Br₅)phenylalanine. Helv. Chim. Acta, vol.66, pp.960-970 (1983)

Leeb-Lunberg,L.M., and Mathis,S.A. J. Biol. Chem., vol.265 pp. 9621-9627 (1990)

Liebmann,C., Offermanas,S., Spicher,S., Hinsch,K-D., Schnittler,M., Morgat,J.L.,
Reismann,S., Schultz,G and Rosenthal,W. Biochem. Biophys. Res. Commun.,
vol. 167 pp.910-917 (1990)

Liebmann,C., Schnittler,M., Nawrath,S., and Jakobs,K.H. Eur. J. Pharmacol. (molec.
Pharmacol.) vol.207 pp.67-71 (1991)

Liebmann,C., Bossé,R. and E.Escher. Discrimination between the bradykinin B₂
receptor and a low picomolar, high affinity binding site with a selective
iodinated bradykinin analogue. Paper submitted to Biophys. Biochem.
Research. Comm. February (1993)

Lowry,O.H., Rosebrough,N.J. Farr,A.L. and Randall,R.J. Protein measurement with
Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., vol.193, pp.265-272 (1951)

Mackiewicz,Z., Belisle,S., Bellabarba,D., Gallo-Payet,N., Lehoux,J. and Escher,E.
Synthesis and placental binding potencies of photosensitive analogues and
leuteinizing hormone releasing hormone (LHRH) with agonistic and
antagonistic structures. Helvet. Chim. Acta, vol.70, pp.423-429 (1987)

Manning,D.C., Vavrek,R., Stewart,J.M. and Snyder,S. Two bradykinin binding sites
with picomolar affinities. Journ. Pharmacol. Exp. Ther. vol.237 pp.504-512

(1986)

Mantlo,N.B., Chakravantky,P.K., Ondeyka,D.L., Siegl,P.K.S., Chang,R.S., Lotti,V.J., Faust,K.A., Chen,T.-B., Scorn,T.W., Sweet,C.S., Emmert,S.E., Patchett,A.A., and Grenlee,W.J. Potent, orally active imidazo[4,5-6]pyridine- based angiotensin II receptor antagonists. J. Med. Chem., vol.34 pp.2919-2922

(1991)

Martin,W.R. Opioid antagonists, Pharmacol. Rev. vol.19, pp. 463-521 (1967)

Mosberg,H.I., Hurst,R., Hruby,V.J. Gee,K., Yamamura,H.I., Galligan,J.J. and Burks,T. Bis-penicillamine enkephalins possess highly improved specificity toward δ opioid receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. vol.80 pp.5871-5874

(1983)

Myers,W.G. Radioisotopes of iodine. Dans Radioactive Pharmaceuticals, Andrews,G.A., Kniseley,R.M. and Wagner,H.N.,Jr., Eds., U.S. Atomic Energy Commission, Oak Ridge, Tenn., (1966)

Neugebauer,W., Bossé,R. et Escher.E. Dans Synthesis and applications of isotopically labeled compounds 1988, T.A. Baillie et J.R. Jones (Editeurs), pages 299-304 (1989)

Olson,G.A., Olson,R.D., Kastin,A.G. and Coy,D.H. Endogenous opiates. Peptides

1982 vol.3, pages 1039-1072 (1981)

Pasternak,G., Wilson,H.A. and Snyder,S. Differential effects of protein-modifying reagents on receptor binding opiate agonists and antagonists. Mol. Pharmacol. vol.11, pp. 340-351 (1975)

Paterson,S.J., Robson,L.E. and Kosterlitz H.W. Control by cations of opioid binding in guinea pig brain membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol(83) pp. 6216-6220 (1986)

Paterson,S.J., Robson,L.E., Kosterlitz H.W. and Jin,W-Q. Effect of Tris, Hepes and Tes buffers on binding at μ -, δ - and κ - opioid binding sites in guinea pig brain. J. Pharmacol. Methods, vol.23 pp.275-283 (1990)

Pavel,D.G., Zimmer,A.M., and Patterson,V.N. In vivo labelling of red blood cells with Tc 99m: a new approach to blood pool visualization. J. Nucl. Med., vol.18, pp.305-308 (1977)

Phillips,P.A., Abrahams,J.M., Kelly,J.M., Mooser,V., Trinder,D. and Johnston,C.I., Localization of vasopressin binding sites in rat tissues using specific V_1 and V_2 selective ligands. Endocrinology vol. 126 pp. 1478-1484 (1990)

Pine,S.H., Hendrickson,J.B., Cram,D.J. and Hammond,G.S. Organic Chemistry. Ouvrage collectif, Mc-Graw-Hill Inc.,N.-Y., U.S.A. page 653 (1980)

- Rang,H.P. Stimulant actions of volatile anaesthetics on smooth muscle. Br. J. Pharmacol., vol.22, pp.356-365 (1964)
- Ransom,R.-W., Goodman,C.B. and Young,C.S. Br. Journ. Pharmacol., vol.105 pp.919-924 (1992)
- Regoli,D. and Barabé,J. Pharmacology of bradykinin. Pharmacol. Rev. vol.32 pp.1-47 (1983)
- Regoli,D., Rhaleb,N.-E., Dion,S. and Drapeau,G. New selective bradykinin receptor antagonist and bradykinin B₂-recptor characterization. Trends. Pharmacol. Sci., vol.11 pp.156-161 (1990)
- Roche,J., Lissitzky,S. and Michel,R. Chromatographic analysis of radioactive iodine compounds from the thyroid gland and body fluids. In Methods of Biochemical Analysis, vol.1, pp.243-264 (1954)
- Ryan,J.W. Processin of the endogenous polypeptides by the lungs. Ann. Rev. Physiol. vol.44, pp.241-255 (1982)
- Sargent,T.,III, Budinger,T.F., Braun,G., Shulgin,A.T. and Braun,U. An iodinated catecholamine congener for brain imaging and metabolic studies. J. Nucl. Med., vol.16, pp.243-251 (1978)

Scatchard,G. The attractions of proteins for small molecules and ions. Annals of the New-York Academy of Sciences, vol.51, pp.660-672 (1949)

Schiller,P., Nguyen,T.M.D. and Lemieux,C. New types of opioid peptide analogs showing high- μ selectivity and preference for either central or peripheral sites. Peptides 1988, Walter de Gruyter & Co., Berlin-New-York. pp.613-615 (1988)

Seevers,R.H. and Counsell,R.E. Radioiodination techniques for small organic molecules. Chemical Reviews, vol.82, pp.575-590 (1982)

Simon,E.J. Opioid receptors and endogenous opioid peptides. Medicinal research reviews, vol.11 (4), pp. 357-374 (1991)

Suehiro,M., Yokoi,F., Nozaki,T. and Iwamoto,M. No-carrier-added radiobromination via the Gatterman reaction. Synthesis of ^{75}Br and ^{77}Br - bromperidol. J. Label. Compounds and Radiopharm., vol.24, pp.1143-1157 (1987)

Toth,G., Kramer,T.H., Knapp,R., Lui,G., Davis,P., Burks,T.F., Yamamura,H. and Hruby,V.J. [D-Pen²,D-Pen⁵]enkephalin analogues with increased affinity and selectivity for δ opioid receptors. J. Med. Chem. vol.33, pp.249-253 (1990)

Tousignant,C., Guillemette,G., Barabé,J., Rhaleb,N.-E. and Regoli,D. Characterization of kinin binding sites: identity of B₂ receptors in the

- epithelium and the smooth muscle of the guinea pig ileum. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 69 pp.818-825 (1991)
- Vaughn,L.K., Knapp,R.J., Toth,G., Wan,Y.-P., Hruby,V.J. and Yamamura,H.I. A high affinity, highly selective ligand for the delta opioid receptor: [³H][D-Pen², pCl-Phe⁴, D-Pen⁵]enkephalin. *Life Sci.* vol.45, pp.1001-1008 (1989)
- Werling,L.L. Zarr,G.D., Brown,S.R. and Cox,B.M. Opioid binding to rat and guinea pig membranes in presence of physiological cations at 37°C. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*,vol.233 (3) pp. 722-728 (1985)
- Whitebread,S., Mele,M., Kamber,B. and De Gasparo,M. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, vol.163, pp.284-291 (1989)
- Yamasu,A., Oh-ishi,S., Ishiduoduma,A. Irsoualta,B., Iridetsa,C., Hayashi,I., Hayashi,K., Hayashi,M., Yamaki,K., Nakano,T. et Sunahara,N. Differentiation of kinin fractions in ureter urine and bladder urine of normal and kininogen-deficient rats. *J. Pharmacobio-Dynamics*, vol.12(5), pp287-292 (1989)
- Yeung,C.W.T. Radioiodinated [D-Ala²,Met⁵] enkephalin. Preparation, purification by high performance liquid chromatography and binding characteristics. *Int. J. Peptide and Protein Res.* vol.24 pp.636-644 (1984)